



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
2-0002017

(51)⁷ **C12N 7/00, C07K 14/09, A61K 39/135** (13) **Y**

(21) 2-2015-00328

(22) 22.10.2015

(45) 27.05.2019 374

(43) 25.12.2015 333

(73) **VIỆN HÓA SINH BIỂN (VN)**

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Phạm Việt Cường (VN), Lê Thị Hồng Minh (VN), Nguyễn Hoàng Dương (VN), Nguyễn Thị Kim Cúc (VN), Vũ Thị Thu Huyền (VN), Nguyễn Thị Hoa (VN), Nguyễn Mai Anh (VN)

(54) **QUY TRÌNH TẠO HẠT GIẢ VIRUT GÂY BỆNH LỞ MỒM LONG MÓNG ĐỂ
SẢN XUẤT VACXIN**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tạo hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng (Picornavirut) để sản xuất vacxin bao gồm các bước: a) phân lập cADN của gen mã hóa VP0 và VP1-2A-VP3; b) khuếch đại đoạn gen VP0 và VP1-2A-VP3; c) tối ưu hóa đoạn gen VP0 và VP1-2A-VP3 để biểu hiện trong tế bào côn trùng; d) tạo bacmit tái tổ hợp; e) tạo baculovirut tái tổ hợp và f) biểu hiện baculovirut tái tổ hợp và tạo hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng. Trong đó gen VP0 và VP1-2A-VP3 được thiết kế để tối ưu hóa biểu hiện trong tế bào côn trùng Sf9. Ngoài ra giải pháp hữu ích còn đề cập đến hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng (Picornavirut) thu được từ quy trình theo sáng chế, trong đó hạt giả virus này được dùng làm vacxin để ngăn ngừa bệnh lở mồm long móng ở động vật do Picornavirut gây ra.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực sinh học phân tử ứng dụng trong y học, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tạo hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng, virus *Picornaviridae* để sản xuất vắc xin để ngăn ngừa và điều trị bệnh lở mồm long móng cho gia súc.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Bệnh lở mồm long móng (LMLM) là bệnh truyền nhiễm xuyên biên giới tấn công vật nuôi và động vật hoang dã ở châu Phi, châu Á và một vài nơi ở Nam Mỹ. Dịch FMD trong những vùng bị bệnh tiếp tục đe dọa ngành chăn nuôi công nghiệp trong những nước không có FMD (có tiêm chủng hoặc không tiêm chủng). [Grubman 2006; Van Phan Le et al., 2010].

Tác nhân gây bệnh, virus lở mồm long móng là loại picornavirus nhỏ thuộc họ *Picornavirut*, không vỏ với 7 typ huyết thanh. Virus này không có vỏ bọc với capsit 20 mặt và chứa một sợi đơn ARN dương. Virus lở mồm long móng có bảy typ là A, O, C, Asia-1, SAT-1, SAT-2, và SAT-3 với hơn 60 typ phụ. Đặc biệt trong typ A, có tới 35 typ phụ ở các thời điểm khác nhau. Một số typ phụ xuất hiện mới và một số biến mất [Baxt et al., 1984]. Virus lở mồm long móng typ huyết thanh O, A và Asia1 là đặc hữu cho các nước Đông Nam Á, nơi thường xuyên có những báo cáo về dịch bệnh. [Knowles et al., 2012].

Hạt virus chứa sợi ARN đơn cực dương, dài khoảng 8500 nucleotit. ARN liên kết hóa trị với một protein nhỏ, VPg ở đầu 5' và sự dịch mã ARN tạo ra một polypeptit đơn (L-P1-P2-P3), mà sau đó được tách thành các protein cấu trúc (từ vùng P1) và không cấu trúc (như proteaza đặc hiệu virus 3C và ARN polymeraza đặc hiệu virus 3D). Capsit của virus không có vỏ bọc và có tính đối xứng 20 mặt (icosahedral symmetry) với đường kính khoảng 300Å, chứa 60 bản sao của từng protein cấu trúc VP1, VP2, VP3 và VP4. Trong khi 3 protein đầu có các thành phần bề mặt (MW≈24 kDa), VP4 (MW≈8.5 kDa) ở bên trong (internal). Virion thường có 1 hoặc 2 đơn vị

VP0, tiền thân của VP2 và VP4. Hình dáng bề mặt của virus hầu như hình cầu và tương đối mịn. Virus có tính đối xứng 20 mặt, mỗi một đơn vị không đối xứng có 5 phần (pentamer) tạo thành do 5 bản sao của protomer sinh học của virus lơ lửng long móng tái sắp xếp [Goodwin et al., 2009].

Hiện đã có một số quy trình sản xuất vaccine để phòng ngừa virus lơ lửng long móng cho động vật, ví dụ, vaccine virus sống, vaccine virus bất hoạt, vaccine dưới đơn vị/tái tổ hợp, vaccine vector virus, vaccine sử dụng kỹ thuật di truyền, vaccine ADN, tuy nhiên, do virus lơ lửng long móng có khả năng biến chủng cao nên những vaccine được phát triển đều ít hiệu quả hoặc hiệu quả kém đối với những khu vực phân bố khác nhau.

Trong quá trình sao chép của virus trong tế bào nhân thực, virus lơ lửng long móng có đặc điểm tự sắp xếp thành các hạt. Đặc điểm này cho phép tạo các hạt giả virus trong hệ nuôi cấy tế bào. Các hạt giả virus này được phân biệt với virus sống giảm độc lực là không gây nhiễm. Chúng không sao chép, không gây bệnh như virus bình thường nhưng vẫn có chức năng kích thích miễn dịch. Vaccine giả virus không đòi hỏi các vật liệu di truyền để tạo các hạt giả virus nên không có những trở ngại trong chiến lược sản xuất vaccine như lại độc, đột biến ngẫu nhiên, sắp xếp lại tự phát. Hệ miễn dịch của động vật có vú nhận biết nhanh chóng và tấn công những hạt giả virus này sau khi tiêm phòng. Vì thể cấu tạo của hạt giả virus tương tự như virion truyền nhiễm, chỉ cần lượng nhỏ kháng nguyên VLP đủ để tạo miễn dịch bảo vệ tương tự. Ngoài ra, các hạt giả virus cho thấy kích thích rất hiệu quả sự tăng sinh tế bào CD4⁺ và đáp ứng tế bào lympho T độc tế bào.

Mặc dù đã sản xuất được hơn 30 loại virus khác nhau nhiễm ở người và động vật và lợi thế chính của vaccine giả virus là trình diện nhiều epitop virus trên một hạt với khả năng kích thích hiệu quả các đáp ứng miễn dịch mà không gây các tác động có hại nghiêm trọng như vaccine virus sống giảm độc lực. Tuy nhiên, vẫn chưa có một loại vaccine dựa trên cơ sở hạt giả virus tạo được kháng nguyên virus typ O, đặc trưng cho các chủng virus *Picornaviridae* gây bệnh lơ lửng long móng cho động vật phổ biến ở Việt Nam.

Virus *Picornaviridae* gây bệnh lơ lửng long móng có khả năng biến chủng cao, do đó nhược điểm của vaccine phòng bệnh lơ lửng long móng chỉ có tác dụng phòng

bệnh cao khi chủng virus được dùng để sản xuất vaccin và chủng virus gây bệnh ngoài thực tại các địa bàn trong nước trong khoảng thời gian giới hạn có sự tương đồng về mặt kháng nguyên. Vì vậy, vaccin sẽ cho hiệu quả phòng bệnh cao nhất khi chủng virus được dùng để sản xuất vaccin được phân lập từ thực địa ở các vùng phát dịch. Mặc dù các chiến lược phòng chống dịch bệnh lở mồm long móng bằng vaccin đơn giá và đa giá ngoại nhập đã và đang được triển khai và áp dụng rộng rãi tại Việt Nam, nhưng hiệu quả phòng bệnh chưa cao, dịch bệnh lở mồm long móng vẫn thường xuyên xảy ra. Điều này cho thấy có thể có một sự sai khác đáng kể về đặc tính kháng nguyên của chủng virus lở mồm long móng gây bệnh ngoài thực địa với chủng virus vaccin. Sự sai khác này sẽ dẫn đến kháng thể kháng virus lở mồm long móng có trong động vật được tiêm phòng không thể bảo vệ được chúng khỏi các chủng virus lở mồm long móng ngoài thực địa.

Do đó, cần có quy trình để tạo kháng nguyên virus *Picornavirut* gây bệnh lở mồm long móng nhằm tạo ra vaccin ngăn ngừa bệnh lở mồm long móng.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Theo một khía cạnh, giải pháp hữu ích đề cập đến cập đến quy trình tạo hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng để sản xuất vaccin bao gồm các bước:

a) phân lập cADN của gen mã hóa VP0 và VP1-2A-VP3:

- tách chiết ARN tổng số của virus gây bệnh lở mồm long móng *Picornavirut* từ mẫu sinh phẩm bằng cách lấy 200µl mẫu, bổ sung 600µl dung dịch phản ứng TriZol vào mẫu, sau khi trộn đều, bổ sung 200µl chloroform, trộn đều và ly tâm 12000xg trong 10 phút ở 4°C, thu phần dịch nổi, bổ sung isopropanol theo tỷ lệ 1:1 và ly tâm ở 12000xg trong 10 phút, thu cặn và rửa bằng etanol 70% rồi ly tâm tiếp ở 7200 vòng/phút trong 10 phút thu được ARN tổng số;

- phiên mã ngược để thu cADN bằng cách bổ sung ARN tổng số với mỗi oligo(dT), sau khi biến tính ARN trong 5 phút, bổ sung đệm dNTP và ủ ở 27°C trong 50 phút, tiếp đó bổ sung enzym phiên mã ngược M-MLV để tổng hợp thu được cADN mạch đơn;

b) khuếch đại đoạn gen VP0 và VP1-2A-VP3:

- khuếch đại gen VP0 bằng cách tiến hành PCR với cặp mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6 và cADN thu được từ bước a) thu được gen VP0 của *Picornavirut* có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1;

- khuếch đại gen VP1-2A-VP3 bằng cách tiến hành PCR với cặp mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.8 và cADN thu được từ bước a) thu được gen VP1-2A-VP3 của *Picornavirut* có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 2;

c) tối ưu hóa đoạn gen VP0 và VP1-2A-VP3 để biểu hiện trong tế bào côn trùng:

- đoạn gen VP0 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 được gắn bổ sung các đoạn mã hóa enzym giới hạn BsshII/NotI; BamHI/HindIII, mã khởi đầu ATG và bộ ba kết thúc ở cuối gen 3C thu được gen VP0⁺ sau khi tối ưu có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3;

- đoạn gen VP1-2A-VP3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 được gắn bổ sung các đoạn mã hóa enzym giới hạn BsshII/NotI; BamHI/HindIII, mã khởi đầu ATG và bộ ba kết thúc ở cuối gen 3C thu được gen VP1-2A-VP3⁺ sau khi tối ưu có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4;

d) tạo bacmit tái tổ hợp:

- cắt mở vòng vectơ pFastBacTMDual và gen VP1-2A-VP3⁺ bằng cách bổ sung enzym *BamHI* và *HindIII*, tiếp đó bổ sung enzym ligaza để tạo ra vectơ pFastBacTMDual mang gen VP1-2A-VP3⁺ và biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* JM109, chọn lọc trên môi trường BL có bổ sung 1% kháng sinh ampicillin, sau đó chiết thu được vectơ pFastBacTMDual mang gen VP1-2A-VP3⁺ tái tổ hợp;

- cắt mở vòng vectơ pFastBacTMDual mang gen VP1-2A-VP3⁺ tái tổ hợp và đoạn gen VP0⁺ bằng enzym *SmaII* và *SphI*, tiếp đó bổ sung enzym ligaza để tạo ra plasmit tái tổ hợp bao gồm vectơ pFastBacTMDual mang gen VP1-2A-VP3⁺ và VP0⁺, phức hợp này được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* JM109, chọn lọc trên môi trường BL có bổ sung 1% kháng sinh ampicillin, sau đó tách thu được bacmit tái tổ hợp chứa gen VP1-2A-VP3⁺ và VP0⁺;

e) tạo baculovirut tái tổ hợp:

- nuôi tế bào côn trùng Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) trong môi trường Sf-900 II SFM có bổ sung 10% FBS (fetal bovine serum: FBS) và 1% penicillin/streptomycin ở nhiệt độ 27°C đến khi đạt 8.10^5 tế bào/ml;

- cấy 8.10^5 tế bào vào giếng nuôi cấy 2ml trong môi trường nuôi cấy tế bào côn trùng Grace không bổ sung FBS và kháng sinh, tiếp đó giữ ở nhiệt độ 27°C trong 15 phút thu được tế bào côn trùng nuôi cấy;

- pha loãng 8µl cellfectin II trong 100µl môi trường Grace, trộn đều, để ở nhiệt độ phòng 30 phút trộn với 1µg baculovirus ADN trong 100µl môi trường Grace, để trong 15 phút và nhỏ vào tế bào côn trùng nuôi cấy và ủ trong 5 giờ ở 27°C, sau đó thay thế bằng môi trường Grace bổ sung 10% FBS và 1% penicillin/streptomycin và nuôi trong 4 ngày;

- thu hồi baculovirus tái tổ hợp bằng cách ly tâm dịch nuôi cấy 3000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C thu được baculovirus tái tổ hợp mang catxet PV0⁺-VP1-2A-VP3⁺; và

f) biểu hiện baculovirus tái tổ hợp và thu hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng:

- nuôi cấy tế bào Sf9 trên môi trường Sf-900 II SFM và bổ sung baculovirus tái tổ hợp thu được từ bước e) nêu trên ở nhiệt độ 27°C trong 3 ngày thu được tế bào bị xâm nhiễm;

- thu tế bào Sf9 bị xâm nhiễm nêu trên và xử lý bằng đệm 0,1% triton X-100 trong PBS, 0,5µg aprotinin/ml, 100µg PMSF/ml, 0,5µg leupeptin/ml, pH 7,4 lysin để thu nhận hỗn hợp protein, sau khi loại cặn bằng cách ly tâm 10.000 vòng/phút trong 20 phút, thu được hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng.

Theo một khía cạnh, gen VP0⁺ và VP1-2A-VP3⁺ là gen VP0 và VP1-2A-VP3 tương ứng của *Picornavirus* được tối ưu để biểu hiện trong tế bào côn trùng Sf9 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3 và SEQ ID NO.4;

Theo một khía cạnh khác, giải pháp hữu ích đề cập đến hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng (*Picornavirus*) thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích, trong đó hạt giả virus này chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.3 và SEQ ID NO.4.

Theo một phương án, hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng theo giải pháp hữu ích được dùng làm vaccin để ngăn ngừa bệnh lở mồm long móng ở động vật do *Picornavirus* gây ra.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là ảnh chụp kết quả gel điện di kết quả phản ứng PCR nhân gen VP0 của *Picornavirut* so với thang chuẩn 1kb của Biobab.

Hình 2 là ảnh chụp kết quả gel điện di kết quả phản ứng PCR nhân gen VP1-VP3-2A của *Picornavirut* so với thang chuẩn.

Hình 3 là sơ đồ cấu trúc của vectơ pFastBacTMDual, vectơ này có kích thước 5238 bp, chứa gen kháng kháng sinh ampicillin, yếu tố mini-Tn7 để chọn lọc gen chuyển và các đoạn cắt bằng enzym giới hạn.

Hình 4 là ảnh chụp kết quả điện di sản phẩm cắt vòng vectơ pFastBacTMDual và gel VP1-2A-VP3⁺ bằng enzym *Bam*HI và *Hnd*III. Trong đó, (1) là sản phẩm cắt gen VP1-2A-VP3⁺, (2) là dấu chuẩn 1kb và (3) là sản phẩm cắt vectơ pFastBacTMDual.

Hình 5 là ảnh chụp kết quả điện di sản phẩm cắt vòng vectơ pFastBacTMDual và gel VP0⁺ bằng enzym *Sma*II và *Sph*I. Trong đó, (1) là sản phẩm cắt gen VP0⁺, M là dấu chuẩn 1kb và (3) là sản phẩm cắt vectơ pFastBacTMDual.

Hình 6 là ảnh chụp khuẩn lạc tế bào JM109 được biến nạp vectơ pFastBacTMDual mang gen VP1-2A-VP3⁺ và VP0⁺ trên môi trường chọn lọc LB có bổ sung 1mg/ml kháng sinh ampicillin (a) và sản phẩm tách plasmid pFastBacTMDual mang gen VP1-2A-VP3⁺ và VP0⁺ (b) và sản phẩm cắt plasmid bằng enzym *Sma*II và *Sph*I (b) thu được từ tế bào JM107 tái tổ hợp.

Hình 7 là ảnh chụp tế bào Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) nuôi cấy trên môi trường Grace theo giải pháp hữu ích trên kính hiển vi ngược pha (100x).

Hình 8 là ảnh chụp tế bào Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) được nhiễm bacmit tái tổ hợp theo giải pháp hữu ích (a) và so với đối chứng (b) trên kính hiển vi ngược pha (250x).

Hình 9 là kết quả kiểm tra phản ứng kháng nguyên-kháng thể chứng tỏ khả năng gây miễn dịch của hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng theo giải pháp hữu ích.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích mô tả chi tiết các phương án thực hiện cụ thể, các phương án này chỉ nhằm mục đích bộc lộ giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Trừ khi có quy định khác, các hóa chất và dung dịch được sử dụng theo sáng chế là các thành phần được dùng trong công nghệ gen và hóa phân tích. Các dung dịch và hóa chất sử dụng đều có thể mua được trên thị trường.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến cập đến quy trình tạo hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng để sản xuất vacxin bao gồm các bước: a) phân lập cADN của gen mã hóa VP0 và VP1-2A-VP3; b) khuếch đại đoạn gen VP0 và VP1-2A-VP3; c) tối ưu hóa đoạn gen VP0 và VP1-2A-VP3 để biểu hiện trong tế bào côn trùng; d) tạo bacmit tái tổ hợp; e) tạo baculovirus tái tổ hợp; và f) biểu hiện baculovirus tái tổ hợp và thu hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng.

Trong bước phân lập cADN của gen mã hóa VP0 và VP1-2A-VP3, mẫu bệnh phẩm thu được từ gia súc mắc bệnh lở mồm long móng được xử lý sơ bộ và tiến hành tách chiết ARN tổng số của virus gây bệnh lở mồm long móng, sau đó tiến hành phiên mã ngược ARN để thu được cADN.

Trong công đoạn tách chiết ARN tổng số, mẫu sinh phẩm là mẫu thu được từ mụn nước, nước bọt, nước tiểu, phân, sữa, dịch cơ thể, v.v., từ gia súc bị mắc bệnh lở mồm long móng do *Picornavirus* gây ra. Mẫu này được xử lý theo quy trình lấy mẫu. Tiếp đó lấy 200µl mẫu, bổ sung 600µl dung dịch phản ứng TriZol vào mẫu và trộn đều. Tiếp đó, bổ sung 200µl chloroform và trộn đều. Sau khi ly tâm 12000xg trong 10 phút ở 4°C, thu phần dịch nổi, bổ sung isopropanol theo tỷ lệ 1:1 và ly tâm ở 12000xg trong 10 phút, thu cặn và rửa bằng etanol 70%. Tiếp đó ly tâm ở 7200 vòng/phút trong 10 phút thu được ARN tổng số.

- phiên mã ngược để thu cADN bằng cách bổ sung ARN tổng số với mỗi oligo(dT), sau khi biến tính ARN trong 5 phút, bổ sung đệm dNTP và ủ ở 27°C trong 50 phút, tiếp đó bổ sung enzym phiên mã ngược M-MLV để tổng hợp thu được cADN mạch đơn;

Trong bước khuếch đại đoạn gen VP0 và VP1-2A-VP3, các gen VP0 và VP1-2A-VP3 được nhân dòng bằng phản ứng PCR với các trình tự mỗi đặc hiệu.

Trong công đoạn khuếch đại gen VP0, sử dụng cADN thu được từ virus lở mồm long móng làm khuôn, cặp mồi được sử dụng để nhân bản có trình tự như sau:

VP0-F: 5' AAC ACT GGG AGC ATC ATT AAC AAC 3' SEQ ID NO.5

VP0-R: 3' GCG GGT GAG TTC CCT TCC AAG GAA 5' SEQ ID NO.6

Quy trình phản ứng PCR được thực hiện theo quy trình chuẩn với 10pM mồi xuôi (VP0-R), 10pM mồi ngược (VP0-F), 2µM cADN, 0,3µl Tag polymeraza, 2nM dNTP trong đệm 10x với nước cất vô trùng đủ 25µl. Chu trình nhiệt bao gồm 94 °C trong 3 phút, 94 °C trong 30 giây, 56 °C trong 1 phút, 72 °C trong 1 phút, 30 chu kỳ, 72 °C trong 5 phút và kết thúc ở 4 °C.

Kết quả thu được cADN mã hóa VP0 của *Picornavirut* có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2, có kích thước 861 bp.

Trong công đoạn khuếch đại gen VP1-2A-VP3, sử dụng cADN thu được từ virus lở mồm long móng làm khuôn, cặp mồi được sử dụng để nhân bản có trình tự như sau:

VP1-2A-VP3-F: 5' gcgcgcggatccATGACCACCTCCACAGGTGAGTCGGC 3' SEQ ID NO.7

VP1-2A-VP3-R: 3' CATCGAGTCCAACCCTGGGCCATAGTAATGAaagcttgc 5' SEQ ID NO.8

Quy trình phản ứng PCR được thực hiện theo quy trình chuẩn với 10pM mồi xuôi (VP1-2A-VP3-R), 10pM mồi ngược (VP1-2A-VP3-F), 2µM cADN, 0,3µl Tag polymeraza, 2nM dNTP trong đệm 10x với nước cất vô trùng đủ 25µl. Chu trình nhiệt bao gồm 94 °C trong 3 phút, 94 °C trong 30 giây, 56 °C trong 1 phút, 72 °C trong 1 phút, 30 chu kỳ, 72 °C trong 5 phút và kết thúc ở 4 °C.

Kết quả thu được cADN mã hóa VP1-2A-VP3 của *Picornavirut* có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2, có kích thước 1359 bp.

Trong bước tối ưu hóa đoạn gen VP0 và VP1-2A-VP3 để biểu hiện trong tế bào côn trùng, các đoạn gen VP0 và VP1-2A-VP3 được cải biến để dễ dàng biểu hiện trong hệ biểu hiện tế bào côn trùng.

Theo một số nghiên cứu (Mohana Subramanian *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2010) enzym 2A chức năng trong việc phân cắt polyprotein P1 thành các protein cấu trúc VP1, VP2 và VP3, do đó chúng được đồng biểu hiện với protein VP1, VP3 và VP0 để

hỗ trợ cho việc phân cắt và tạo VLP sau khi biểu hiện. Trình tự nucleotide của VP1-2A-VP3 được gắn với nhau thành 1 chuỗi mã hóa cho 1 polyprotein. Trong đó trình tự khởi đầu và kết thúc được thiết kế thêm 2 cặp enzym cắt giới hạn BssH II/Not I; BamHI/HindIII phù hợp với vector pFastbac dual, mã khởi đầu ATG và 3 bộ 3 kết thúc ở cuối gen 3C. Các bộ 3 được tối ưu hóa cho sự biểu hiện trong tế bào sf9 được thực hiện trên phần mềm chuyên dụng của Genscript-USA. Kết quả thu được trình tự gen VP0 và VP1-2A-VP3 được tối ưu hóa. Trình tự này được đặt tên là VP0⁺ và VP1-2A-VP3⁺.

Kết quả thu được trình tự tối ưu VP0⁺ và VP1-2A-VP3⁺ có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3 và SEQ ID NO.4 tương ứng.

Trong đó VP0⁺ là đoạn gen VP0 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 được gắn bổ sung các đoạn mã hóa enzym giới hạn BssHII/NotI; BamHI/HindIII, mã khởi đầu ATG và bộ ba kết thúc ở cuối gen 3C thu được gen VP0⁺ sau khi tối ưu có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3.

Đoạn gen VP1-2A-VP3⁺ là đoạn gen VP1-2A-VP3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 được gắn bổ sung các đoạn mã hóa enzym giới hạn BssHII/NotI; BamHI/HindIII, mã khởi đầu ATG và bộ ba kết thúc ở cuối gen 3C thu được gen VP1-2A-VP3⁺ sau khi tối ưu có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4.

Trong bước tạo bacmit tái tổ hợp, vector pFastBacTMDual và gen VP1-2A-VP3⁺ được cắt và tái tổ hợp để thu vector tái tổ hợp mang gen VP1-2A-VP3⁺, sau đó vector tái tổ hợp này được tái tổ hợp với gen VP0⁺ thu được vector tái tổ hợp mang gen VP1-2A-VP3⁺ và VP0⁺.

Vector pFastBacTMDual là vector thương mại của hãng Invitrogen được dùng làm vector gốc để biểu hiện các đoạn gen kháng nguyên của virus lở mồm long móng theo sáng chế. Đây là vector có độ dài 5238 bp, cấu trúc vector được nêu trong Hình 3. Vector này bao gồm gen chọn lọc kháng kháng sinh ampicillin, yếu tố mini- Tn7, yếu tố này được cắt khỏi ADN thể cho và gắn vào phân tử ADN mục tiêu là baculovirus. Yếu tố chuyển vị Tn7 này có chứa gen kháng kháng sinh là gentamicin – đây chính là dấu chuẩn để xác định sự chuyển vị được chèn vào. Ngoài ra, vector này còn chứa các trình tự thuận lợi cho việc cắt bằng nhiều loại các enzym giới hạn tùy ý.

Các tế bào *E.coli* JM109, tế bào Sf9 được sử dụng theo giải pháp hữu ích là sản phẩm thương mại của hãng Invitrogen được bán trên thị trường. Đồng thời, các môi trường Sf-900 II SFM, môi trường Grace là môi trường nuôi cấy tế bào đã được biết bởi người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Trong công đoạn tạo plasmid tái tổ hợp mang gen VP1-2A-VP3⁺, vector pFastBacTMDual được cắt mở vòng và gen VP1-2A-VP3⁺ được cắt bằng enzym *Bam*HI và *Hind*III. Trình tự và cách tiến hành được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tiếp đó, tiến hành tái tổ hợp bằng cách bổ sung enzym ligaza để tạo ra vector pFastBacTMDual mang gen VP1-2A-VP3⁺. Sau đó biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* JM109 theo quy trình chuẩn. Các tế bào biến nạp thành công được chọn lọc trên môi trường BL có bổ sung 1% kháng sinh ampicillin. Tiếp đó, tiến hành chiết để thu plasmid là vector pFastBacTMDual mang gen VP1-2A-VP3⁺ tái tổ hợp.

Trong công đoạn tạo bacmit tái tổ hợp mang gen VP1-2A-VP3⁺ và VP0⁺, vector pFastBacTMDual mang gen VP1-2A-VP3⁺ tái tổ hợp thu được ở trên cắt mở vòng và đoạn gen VP0⁺ được cắt bằng enzym *Small*I và *Sph*I. Trình tự và cách tiến hành được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tiếp đó tiến hành gắn các đoạn gen VP0⁺ vào vector mở vòng bằng cách bổ sung enzym ligaza để tạo ra plasmid tái tổ hợp bao gồm vector pFastBacTMDual mang gen VP1-2A-VP3⁺ và VP0⁺. Sau đó, phức hợp này được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* JM109 theo quy trình biến nạp chuẩn được khuyến cáo bởi nhà sản xuất. Tiếp đó, chọn lọc trên môi trường BL có bổ sung 1% kháng sinh ampicillin và tách thu được bacmit tái tổ hợp chứa đồng thời cả gen VP1-2A-VP3⁺ và VP0⁺.

Trong bước tạo baculovirus tái tổ hợp, bacmit được cho lây nhiễm vào tế bào côn trùng sau đó nuôi cấy và chọn lọc trên môi trường nuôi cấy có bổ sung kháng sinh và thu hồi baculovirus.

Tế bào côn trùng Sf9 (*Spodotera frugiperda*) được nuôi cấy trong môi trường Sf-900 II SFM có bổ sung 10% FBS (fetal bovin serum: FBS) và 1% penicillin/streptomycin ở nhiệt độ 27°C đến khi đạt 8.10^5 tế bào/ml. Quy trình nuôi cấy và xác định mật độ tế bào được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tiếp đó, cấy 8.10^5 tế bào vào giếng nuôi cấy 2ml trong môi trường nuôi cấy tế bào côn trùng Grace không bổ sung FSB và kháng sinh, tiếp đó giữ ở nhiệt độ 27°C trong 15 phút thu được tế bào côn trùng nuôi cấy.

Sau khi pha loãng $8\mu\text{l}$ cellfectin II trong $100\mu\text{l}$ môi trường Grace, trộn đều, để ở nhiệt độ phòng 30 phút, tiến hành trộn với $1\mu\text{g}$ baculovirus ADN trong $100\mu\text{l}$ môi trường Grace, để trong 15 phút. Tiếp đó nhỏ dung dịch này vào tế bào côn trùng nuôi cấy và ủ trong 5 giờ ở 27°C . Sau khi thay thế môi trường nuôi cấy bằng môi trường Grace bổ sung 10% FSB và 1% penicillin/streptomycin, tiến hành nuôi cấy tế bào trong 4 ngày thu được tế bào được lây nhiễm baculovirus.

Tiến hành thu hồi baculovirus tái tổ hợp bằng cách ly tâm dịch nuôi cấy 3000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C thu được baculovirus tái tổ hợp mang catxet $\text{PV0}^+ \text{-VP1-2A-VP3}^+$.

Trong bước biểu hiện baculovirus tái tổ hợp và thu hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng, tế bào Sf9 được nuôi cấy làm tế bào chủ để xâm nhiễm baculovirus tái tổ hợp và thu hạt giả virus được biểu hiện trong tế bào.

Tiến hành nuôi cấy tế bào Sf9 trên môi trường Sf-900 II SFM và bổ sung baculovirus tái tổ hợp thu được ở trên ở nhiệt độ 27°C . Sau 3 ngày thu được tế bào bị xâm nhiễm.

Tiếp đó thu tế bào Sf9 bị xâm nhiễm và xử lý bằng đệm 0,1% triton X-100 trong PBS, $0,5\mu\text{g}$ aprotinin/ml, 100lg PMSF/ml, $0,5\mu\text{g}$ leupeptin/ml, pH 7,4 lysin để thu nhận hỗn hợp protein, sau khi loại cặn bằng cách ly tâm 10.000 vòng/phút trong 20 phút, thu được hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng.

Theo một khía cạnh khác, giải pháp hữu ích đề cập đến hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng (*picornavirus*) thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích, trong đó hạt giả virus này chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.3 và SEQ ID NO.4.

Theo một phương án của khía cạnh này, hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng theo giải pháp hữu ích được dùng làm vaccin để ngăn ngừa bệnh lở mồm long móng ở động vật do *Picornavirus* gây ra.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Tạo hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng

Mẫu bệnh phẩm là mẫu bệnh lở mồm long móng của lợn được xử lý theo quy trình chuẩn được thu thập tại Hà Nội được ký hiệu là O/VN/HN1/2013.

Hút 200 μ l mẫu 10% đã được lựa chọn ra các ống eppendorf 1,5ml vô trùng. Sau đó bổ sung 600 μ l dung dịch TriZol vào mỗi ống chứa mẫu, trộn đều hỗn hợp. Tiếp đó bổ sung 200 μ l clorofom vào mỗi ống và trộn đều một lần nữa. Tiến hành ly tâm 12000 xg trong 10 phút ở 4 °C.

Sau khi ly tâm xong, thu phần dịch nổi phía trên cùng (khoảng 500 μ l) cho sang ống eppendorf vô trùng mới. Tiến hành kết tủa ARN bằng cách bổ sung isopropanol theo tỉ lệ 1:1 và ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó ly tâm 12000 xg trong 10 phút ở 4°C thu cặn và rửa kết tủa bằng dung dịch ethanol 70% 1ml/ống. Ly tâm 7500 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Sau đó đổ cặn và làm khô tủa ở nhiệt độ phòng trong 5 phút thu được ARN tinh sạch.

Kết quả kiểm tra độ tinh sạch được kiểm tra bằng quang phổ kế xác định độ hấp phụ ở bước sóng 260 nm (A_{260}) và 280 nm (A_{280}). Kết quả thu được như sau:

Số TT	Địa điểm lấy mẫu	Giá trị A_{260}/A_{280}	Nồng độ (ng/ μ l)
1	Hà Nội	1,79	28,17

Tiến hành PCR để nhân trình tự VP0 với cặp mồi sử dụng là:

VP0-F: 5' AAC ACT GGG AGC ATC ATT AAC AAC 3'

VP0-R: 3' GCG GGT GAG TTC CCT TCC AAG GAA 5'

Thành phần phản ứng PCR theo bảng sau:

Thành phần phản ứng	Nồng độ	Thể tích (μ l)
Nước cất vô trùng		16,2
Đệm	10 X	2,5
dNTP	2 nM	2
VP0-F	10 pM	1
VP0-R	10 pM	1
Taq polymeraza		0,3
cADN		2
Tổng		25

Chu trình nhiệt: 94 °C 3 phút, 94 °C 30 giây, 56 °C 1 phút, 72 °C 1 phút, 30 chu kỳ, 72 °C 5 phút, kết thúc ở 4 °C. Kết quả của phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện

di trên gel agarosa 1% như được thể hiện trên hình 2. Kết quả giải trình tự thu được trình tự nêu trong SEQ ID No.1.

Tiến hành PCR để nhân trình tự VP1-2A-VP3 với cặp mồi sử dụng là:

VP1-2A-VP3-F: 5' gcgcgcggatccATGACCACCTCCACAGGTGAGTCGGC 3'

VP1-2A-VP3-R: 3' CATCGAGTCCAACCCTGGGCCATAGTAATGAaagcttgc 5'

Thành phần phản ứng PCR theo bảng sau:

Thành phần phản ứng	Nồng độ	Thể tích (μ l)
Nước cất vô trùng		16,2
Đệm	10 X	2,5
dNTP	2 nM	2
VP1-2A-VP3-F	10 pM	1
VP1-2A-VP3-R	10 pM	1
Taq polymeraza		0,3
cDNA		2
Tổng		25

Chu trình nhiệt: 94 °C 3 phút, 94 °C 30 giây, 56 °C 1 phút, 72 °C 1 phút, 30 chu kỳ, 72 °C 5 phút, kết thúc ở 4 °C. Kết quả của phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 1% như được thể hiện trên hình 3. Kết quả giải trình tự thu được trình tự nêu trong SEQ ID No.2.

Tiếp đó, dựa vào trình tự của VP0 và VP1-2A-VP3, tiến hành tối ưu hóa bằng phần mềm Genscript-USA dựa trên trình tự SEQ ID No.1 và SEQ ID No.2 thu được VP0⁺ và VP1-2A-VP3⁺ có trình tự nêu trong SEQ ID No.3 và SEQ ID No.4. Hai trình tự này được đặt hàng để tổng hợp bởi Genscript (USA).

Cắt vector pFastBacTM Dual và gen VP1-2A-VP3 bằng enzym tương ứng là *Bam*HI và *Hind*III. Kết quả phản ứng cắt được kiểm tra trên gel agarosa như được thể hiện trên hình 4. Tiếp đó đoạn gen VP1-2A-VP3 được gắn vào vector bằng enzym ligaza. Và biến nạp vào tế bào khả biến E. Coli JM109. Tiếp đó, chọn lọc trên môi trường BL có bổ sung 1% kháng sinh ampicillin và tách thu được bacmit tái tổ hợp chứa đồng thời cả gen VP1-2A-VP3⁺.

Trong công đoạn tạo plasmit tái tổ hợp mang gen VP1-2A-VP3⁺, vector pFastBacTMDual được cắt mở vòng và gen VP1-2A-VP3⁺ được cắt bằng enzym

*Bam*HI và *Hind*III. Trình tự và cách tiến hành được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tiếp đó, tiến hành tái tổ hợp bằng cách bổ sung enzym ligaza để tạo ra vectơ pFastBacTMDual mang gen VP1-2A-VP3⁺. Sau đó biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* JM109 theo quy trình chuẩn. Các tế bào biến nạp thành công được chọn lọc trên môi trường BL có bổ sung 1% kháng sinh ampicillin. Tiếp đó, tiến hành chiết để thu plasmit là vectơ pFastBacTMDual mang gen VP1-2A-VP3⁺ tái tổ hợp.

Tiếp đó, vectơ pFastBacTMDual mang gen VP1-2A-VP3⁺ tái tổ hợp này được cắt bằng enzym *Sma*I và *Sph*I và trộn với gen VP0⁺ được cắt bằng enzym *Sma*I và *Sph*I và enzym ligaza theo hướng dẫn của nhà sản xuất vectơ để tạo ra plasmit tái tổ hợp bao gồm vectơ pFastBacTMDual mang gen VP1-2A-VP3⁺ và VP0⁺. Kết quả kiểm tra việc cắt vectơ pFastBacTMDual mang gen VP1-2A-VP3⁺ và VP0⁺ được thể hiện trên Hình 5. Sau đó, phức hợp này được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* JM109 theo quy trình biến nạp chuẩn được khuyến cáo bởi nhà sản xuất. Cây tế bào sau khi biến nạp *E.coli* JM109 lên môi trường BL có bổ sung 1% kháng sinh ampicillin và tách thu được bacmit tái tổ hợp chứa đồng thời cả gen VP1-2A-VP3⁺ và VP0⁺. Kết quả kiểm tra được thể hiện trên Hình 6.

Trên Hình 6 có thể thấy đã tách được plasmit mang đồng thời 2 gen VP-2A-VP3⁺ và gen VP0⁺, để sơ bộ kiểm tra 3 plasmit có được cho là mang gen VP0⁺ được cắt kiểm tra bằng cặp enzyme *Sma*I và *Sph*I thể hiện trên hình (c) sản phẩm cắt có roi 1 băng có kích thước khảng 897bp nằm giữa băng 750bp và băng 1000bp chứng tỏ bước đầu có thể khẳng định đã gắn được gen VP0 vào vectơ pFastBacTMDual VP1-2A-VP3. Kết quả giải trình tự đã khẳng định việc nhân dòng thành công 2 đoạn gen VP0⁺, VP1-2A-VP3⁺ vào pFastBac Dual.

Tế bào côn trùng Sf9 được nuôi trong môi trường Sf-900 II SFM (Invitrogen) có bổ sung 10% FBS (Fetal Bovin Serum) và 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) ở nhiệt độ 27 °C trong bình nuôi cấy T75 dưới dạng bảm đáy bình. Tiếp đó cấy chuyển 3 lần để làm tăng sinh số lượng tế bào 8.10^5 trước khi được lây nhiễm với bacmit. Kết quả nuôi cấy được thể hiện trên Hình.7.

Tế bào côn trùng Sf9 được đếm và chia ra đĩa nuôi cấy 6 giếng ở mật độ 8×10^5 tế bào/giếng với thể tích là 2ml trong môi trường nuôi cấy tế bào côn trùng Grace

không bổ sung FBS và không chứa kháng sinh. Để đĩa trong tủ ấm 27 °C ít nhất 15 phút để cho phép tế bào bám đáy đĩa nuôi. Tiếp đó, pha loãng 8 µl Cellfectin II trong 100 µl môi trường Grace Medium không bổ sung kháng sinh và huyết thanh, trộn đều và để ở nhiệt độ phòng trong 30 phút.

Pha loãng 1 µg baculovirus ADN trong 100 µl Grace's Medium không bổ sung kháng sinh và huyết thanh, trộn nhẹ.

Sau đó trộn đều ADN và Cellfectin II đã pha loãng với nhau rồi để ở nhiệt độ phòng khoảng 15 phút. Hỗn hợp này sau đó sẽ được nhỏ giọt vào tế bào côn trùng đã chuẩn bị sẵn. Ủ tế bào ở 27 °C trong khoảng 5 giờ.

Tiếp theo, môi trường được thay thế bằng môi trường Grace bổ sung 10% FBS và kháng sinh (Penicillin/Streptomycin). Ủ tế bào ở 27°C khoảng 72 giờ và sau đó thu dịch nuôi cấy để kiểm tra sự nhiễm baculovirus bằng kính hiển ngược pha. Kết quả thể hiện trên Hình 8, trong đó baculovirus tái tổ hợp nhân lên trong tế bào Sf9 so với đối chứng sau 3 ngày xâm nhiễm (250x).

Sự thay đổi hình thái của tế bào sau khi bị xâm nhiễm bởi virus được miêu tả như trong bảng sau:

Thời gian	Trạng thái của tế bào sau khi lây nhiễm
1 ngày	Màng tế bào phồng nhiều chỗ.
2 ngày	Tế bào đã bị nhiễm, hình dạng thay đổi rõ rệt, tế bào từ dạng tròn trở thành dạng amip, không phân chia. Nhìn rõ thể hạt trong nhân và trong tế bào chất, đa số tế bào tách khỏi bề mặt.
>3 ngày	Phần lớn tế bào đã bị nhiễm, thể vùi lớn tràn ra khỏi nhân và bắt đầu ra ngoài tế bào.

Ngày thứ 4 sau khi xâm nhiễm virus tái tổ hợp được thu hồi bằng cách ly tâm 3000 vòng/phút trong 5 phút hỗn hợp dịch nổi và xác tế bào ở 4 °C. Dịch virus được giữ ở 4 °C trong thời gian 2 tháng và -80 để bảo quản trong thời gian dài.

Tiếp đó, Tiến hành nuôi cấy tế bào Sf9 trên môi trường Sf-900 II SFM và bổ sung baculovirus tái tổ hợp thu được ở trên ở nhiệt độ 27°C. Sau 3 ngày thu được tế bào bị xâm nhiễm.

Tiếp đó thu tế bào Sf9 bị xâm nhiễm và xử lý bằng đệm 0,1% triton X-100 trong PBS, 0,5 μ g aprotinin/ml, 100 μ g PMSF/ml, 0,5 μ g leupeptin/ml, pH 7,4 lysin để thu nhận hỗn hợp protein, sau khi loại cặn bằng cách ly tâm 10.000 vòng/phút trong 20 phút, thu được hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng.

Ví dụ 2. Kiểm tra tính đặc hiệu của hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng

Để kiểm tra tính đặc hiệu của hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng đối với khả năng gây miễn dịch. Tiến hành thử nghiệm thấm tách Western (immunoblotting) để xác định kháng nguyên đặc hiệu bằng kháng thể đơn dòng.

Sử dụng WB để xác định kháng nguyên của hạt giả virus thu từ Ví dụ 1. Protein tái tổ hợp được phân tách trên SDS-PAGE 10% và chuyển lên màng polyvinylidenedifluorit (PVDF) 0,4 μ m, bằng hệ thống chuyển màng ướt của hãng Invitrogen. Màng được phủ bởi 5% sữa gầy trong đệm 1x PBS-T trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó màng được ủ với kháng thể 1 (kháng thể kháng FMDV) ở độ pha loãng 1:1000 qua đêm ở 4 °C. Sau đó, màng được rửa 4 lần với 1x PBS-T (10 phút/lần) và nhuộm với kháng thể 2 có liên kết với HRP trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng (1:5000). Màng được rửa với 1x PBS-T 4 lần (10 phút/lần) và ủ với cơ chất luminescenc. Hình ảnh được hiện lên autoradiograph film.

Hạt giả virus được soi trên kính hiển vi điện tử. Tế bào Sf9 sau khi được xâm nhiễm với baculovirus tái tổ hợp được. Sau 3 ngày xâm nhiễm hỗn hợp protein được thu nhận sau khi xử lý bằng lysis buffer (0.1% Triton X-100 in PBS, pH 7.4, 0.5 μ g aprotinin/ml, 100 μ g PMSF/ml, 0.5 μ g leupeptin/ml). Cặn tế bào được loại bỏ sau khi ly tâm ở tốc độ 10.000 rpm trong 20 phút. Dịch nổi chứa hỗn hợp protein được ủ trong kháng thể kháng FMDV từ thỏ với tỉ lệ 1:1000 trong 1x PBS. Hỗn hợp kháng nguyên kháng thể được kết tủa bằng phương pháp ly tâm ở tốc độ thấp 3000 g, 20 phút ở 4 °C. Hỗn hợp protein được rửa 2 lần với 1xPBS sau đó được xử lý để soi bằng kính hiển vi điện tử. Kết quả cho thấy rằng đã tạo ra phức hợp kháng nguyên – kháng thể, điều này cho thấy rằng hạt giả virus có khả năng tạo miễn dịch.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp tạo hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng, trong đó trình tự của VP0, VP1-2A-VP3 được cải biến sao cho dễ dàng nhân dòng được trong tế bào côn trùng mà vẫn giữ được tính đặc hiệu kháng nguyên, tránh được hiện tượng gây nhiễm virus cho đối tượng được chủng ngừa bằng chủng virus giảm độc lực.

Hạt giả virus theo giải pháp hữu ích mang catxet biểu hiện VP0-VP1-2A-VP3 có trình tự được cải tiến được biểu hiện trong tế bào côn trùng mà vẫn giữ được tính đặc hiệu kháng nguyên, điều này hoàn toàn có thể ứng dụng để sản xuất vắc xin ngăn ngừa bệnh lở mồm long móng do virus *Pinarcovirus* gây ra.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình tạo hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng để sản xuất vacxin bao gồm các bước:

a) Phân lập cADN của gen mã hóa VP0 và VP1-2A-VP3:

- Tách chiết ARN tổng số của virus gây bệnh lở mồm long móng *Picornavirut* từ mẫu sinh phẩm bằng cách lấy 200 μ l mẫu, bổ sung 600 μ l dung dịch phản ứng TriZol vào mẫu, sau khi trộn đều, bổ sung 200 μ l chloroform, trộn đều và ly tâm 12000xg trong 10 phút ở 4°C, thu phần dịch nổi, bổ sung isopropanol theo tỷ lệ 1:1 và ly tâm ở 12000xg trong 10 phút, thu cặn và rửa bằng etanol 70% rồi ly tâm tiếp ở 7200 vòng/phút trong 10 phút thu được ARN tổng số;

- Phiên mã ngược để thu cADN bằng cách bổ sung ARN tổng số với mỗi oligo(dT), sau khi biến tính ARN trong 5 phút, bổ sung đệm dNTP và ủ ở 27°C trong 50 phút, tiếp đó bổ sung enzym phiên mã ngược M-MLV để tổng hợp thu được cADN mạch đơn;

b) Khuếch đại đoạn gen VP0 và VP1-2A-VP3:

- Khuếch đại gen VP0 bằng cách tiến hành PCR với cặp mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6 và cADN thu được từ bước a) thu được gen VP0 của *Picornavirut* có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1;

- Khuếch đại gen VP1-2A-VP3 bằng cách tiến hành PCR với cặp mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.8 và cADN thu được từ bước a) thu được gen VP1-2A-VP3 của *Picornavirut* có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 2;

c) Tối ưu hóa đoạn gen VP0 và VP1-2A-VP3 để biểu hiện trong tế bào côn trùng:

- Đoạn gen VP0 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 được gắn bổ sung các đoạn mã hóa enzym giới hạn *BsshII/NotI*; *BamHI/HindIII*, mã khởi đầu ATG và bộ ba kết thúc ở cuối gen 3C thu được gen VP0⁺ sau khi tối ưu có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3;

- Đoạn gen VP1-2A-VP3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 được gắn bổ sung các đoạn mã hóa enzym giới hạn *BsshII/NotI*; *BamHI/HindIII*, mã khởi đầu ATG và bộ ba kết thúc ở cuối gen 3C thu được gen VP1-2A-VP3⁺ sau khi tối ưu có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4;

d) Tạo bacmit tái tổ hợp:

- Cắt mở vòng vector pFastBacTMDual và gen VP1-2A-VP3+ bằng cách bổ sung enzym *Bam*HI và *Hind*III, tiếp đó bổ sung enzym ligaza để tạo ra vector pFastBacTMDual mang gen VP1-2A-VP3+ và biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* JM109, chọn lọc trên môi trường BL có bổ sung 1% kháng sinh ampicillin, sau đó chiết thu được vector pFastBacTMDual mang gen VP1-2A-VP3+ tái tổ hợp;

- Cắt mở vòng vector pFastBacTMDual mang gen VP1-2A-VP3+ tái tổ hợp và đoạn gen VP0⁺ bằng enzym *Sma*II và *Sph*I, tiếp đó bổ sung enzym ligaza để tạo ra plasmit tái tổ hợp bao gồm vector pFastBacTMDual mang gen VP1-2A-VP3⁺ và VP0⁺, phức hợp này được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* JM109, chọn lọc trên môi trường BL có bổ sung 1% kháng sinh ampicillin, sau đó tách thu được bacmit tái tổ hợp chứa gen VP1-2A-VP3⁺ và VP0⁺;

e) Tạo baculovirut tái tổ hợp:

- Nuôi tế bào côn trùng Sf9 (*Spodotera frugiperda*) trong môi trường Sf-900 II SFM có bổ sung 10% FSB (fetal bovin serum: SFB) và 1% penicillin/streptomycin ở nhiệt độ 27°C đến khi đạt 8.10^5 tế bào/ml;

- cấy 8.10^5 tế bào vào giếng nuôi cấy 2ml trong môi trường nuôi cấy tế bào côn trùng Grace không bổ sung FSB và kháng sinh, tiếp đó giữ ở nhiệt độ 27°C trong 15 phút thu được tế bào côn trùng nuôi cấy;

- Pha loãng 8μl cellfectin II trong 100μl môi trường Grace, trộn đều, để ở nhiệt độ phòng 30 phút trộn với 1μg baculovirut ADN trong 100μl môi trường Grace, để trong 15 phút và nhỏ vào tế bào côn trùng nuôi cấy và ủ trong 5 giờ ở 27°C, sau đó thay thế bằng môi trường Grace bổ sung 10% FSB và 1% penicillin/streptomycin và nuôi trong 4 ngày;

- Thu hồi baculovirut tái tổ hợp bằng cách ly tâm dịch nuôi cấy 3000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C thu được baculovirut tái tổ hợp mang catxet PV0⁺-VP1-2A-VP3⁺; và

f) Biểu hiện baculovirut tái tổ hợp và thu hạt giả virut gây bệnh lở mồm long móng:

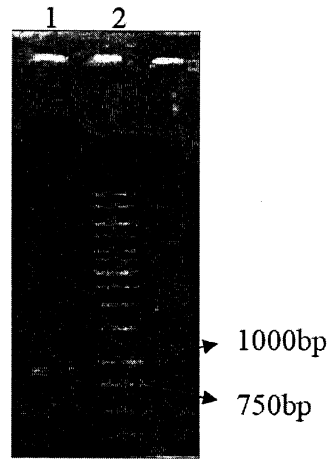
- Nuôi cấy tế bào Sf9 trên môi trường Sf-900 II SFM và bổ sung baculovirut tái tổ hợp thu được từ bước e) nêu trên ở nhiệt độ 27°C trong 3 ngày thu được tế bào bị xâm nhiễm;

- Thu tế bào Sf9 bị xâm nhiễm nêu trên và xử lý bằng đệm 0,1% triton X-100 trong PBS, 0,5μg aproinin/ml, 100lg PMSF/ml, 0,5μg leupectin/ml, pH 7,4 lysin để thu

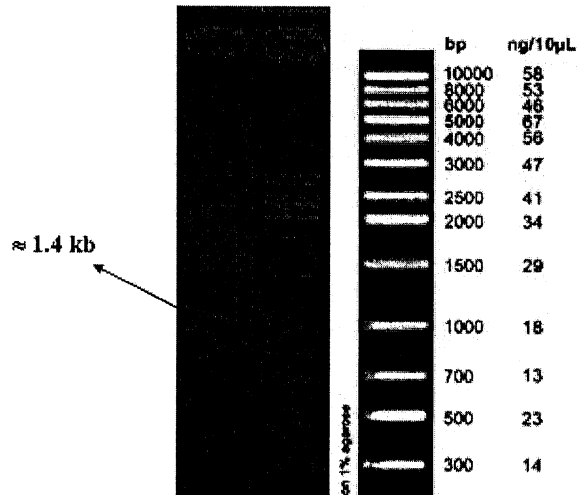
2017

nhận hỗn hợp protein, sau khi loại cặn bằng cách ly tâm 10.000 vòng/phút trong 20 phút, thu được hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng.

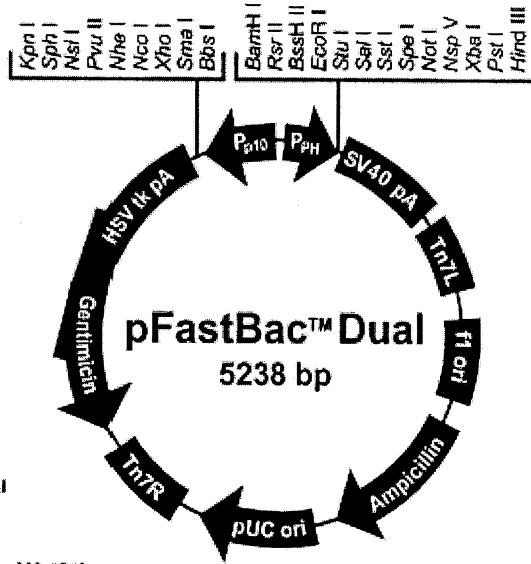
HÌNH 1



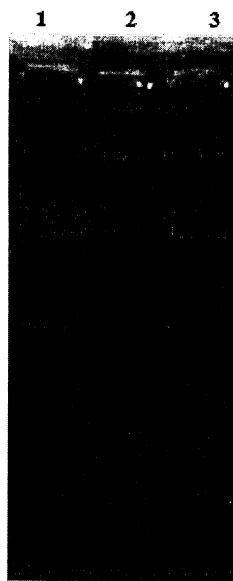
HÌNH 2



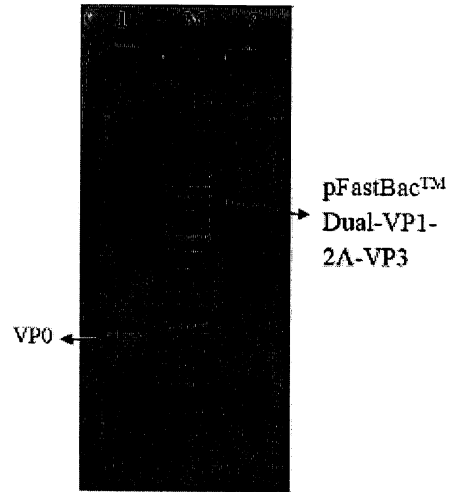
HÌNH 3



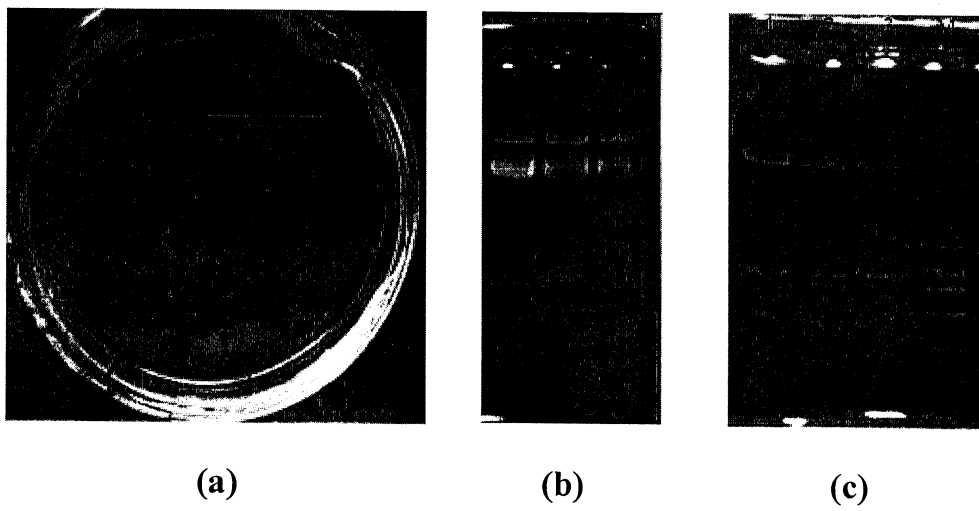
HÌNH 4



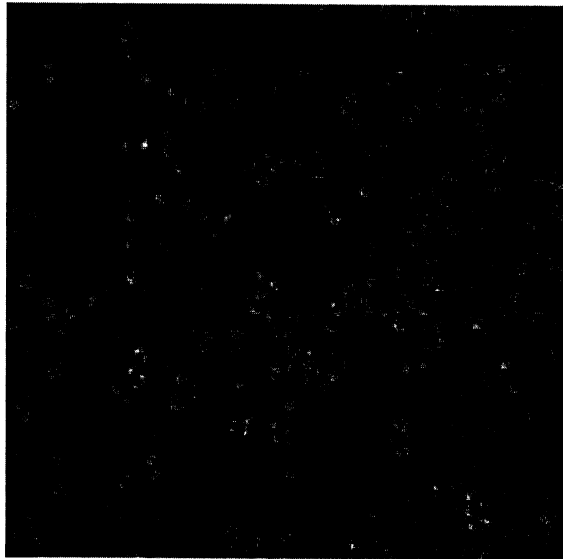
HÌNH 5



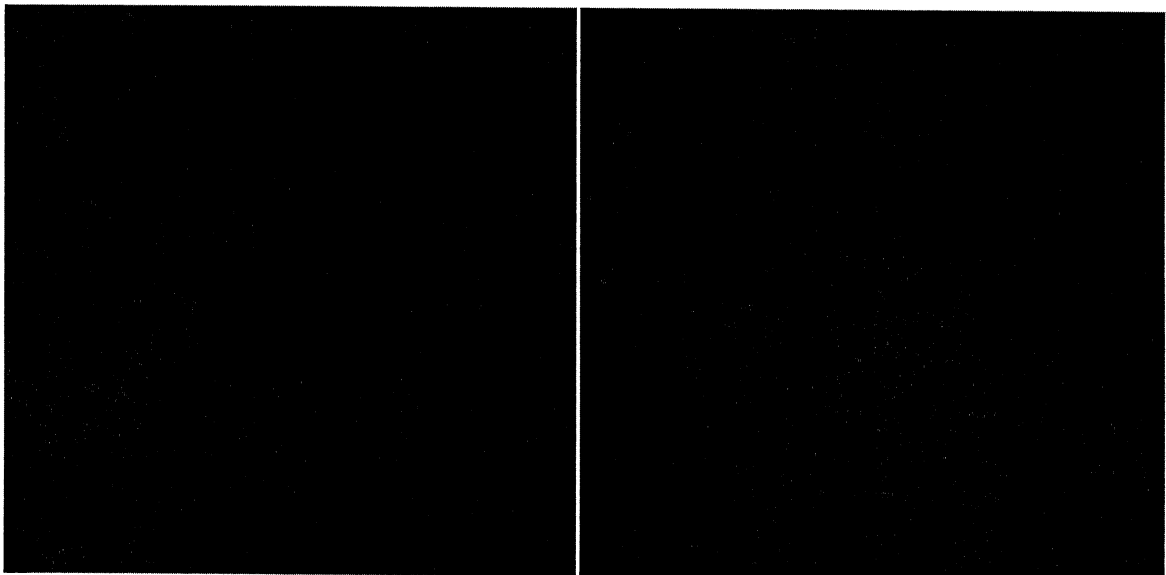
HÌNH 6



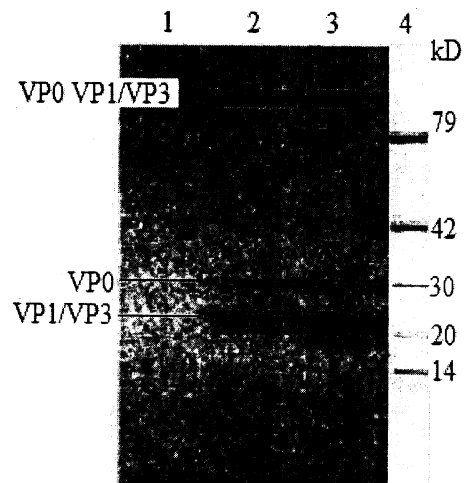
HÌNH 7



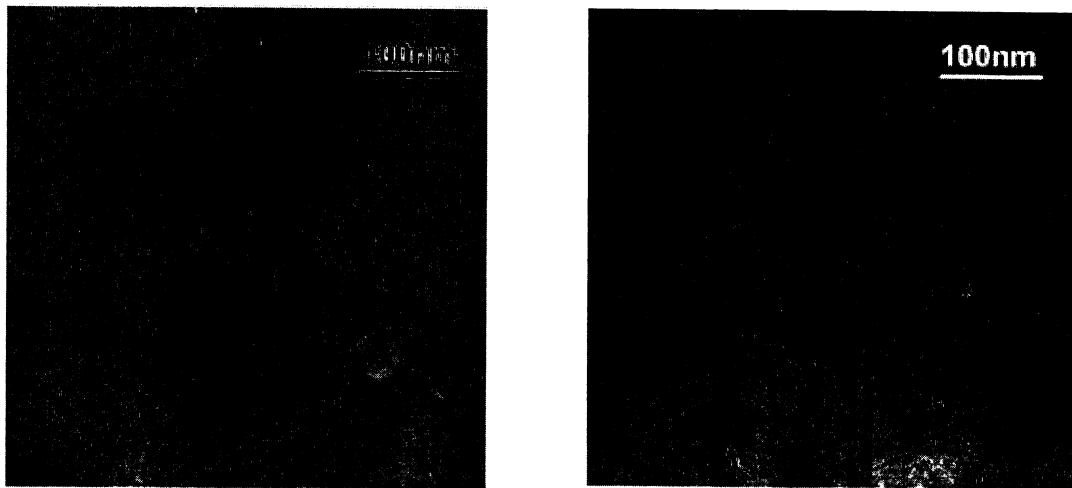
HÌNH 8



HÌNH 9



HÌNH 10



(a)

(b)

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	Viện Hóa sinh Biển				
<120>	Quy trình tạo hạt giả virus gây bệnh lở mồm long móng để sản xuất vacxin				
<130>					
<160>	8				
<170>					
<210>	1				
<211>	861				
<212>	ADN				
<213>	Trình tự VP0 của Picornaviridae				
<220>					
<223>					
<220>					
<400>	1				
AACACTGGGA	GCATCATTAA	CAACTACTAC	ATGCAACAAT	ATCAGAACTC	50
CATGGACACA	CAACTTGGTG	ACAACGCTAT	TAGCGGAGGC	TCCAACGAGG	100
GGTCCACGGA	CACCACCTCC	ACCCACACAA	CCAACACTCA	GAATAATGAC	150
TGGTTTTCAA	AGCTGGCCAG	TTCCGCCTTC	AGCGGTCTCT	TCGGCGCTCT	200
TCTCGCCGAC	AGGAAAACCG	AGGAGACCAC	TCTTCTCGAG	GACCGCATCC	250
TCACTACCCG	CAACGGACAT	ACGACTTCGA	CAACCCAGTC	GAGCGTTGGA	300
GTCACCTACG	GGTATGCAAC	AGCTGAGGAT	TTCGTGAGCG	GACCAAACAC	350
GCCTGGACTT	GAGACCCGAG	TTACACAGGC	AGAGCGATTC	TTCAAAACCC	400
ACTTGTTTCGA	TTGGGTCACC	AGTGACCCGT	TCGGACGATG	CTACCTGCTG	450
GAACTTCCGA	CTGACCACAA	AGGTGTGTAC	GGCAGCCTGA	CTGATTCCCTA	500
TGCTTACATG	AGGAACGGTT	GGGATGTCGA	GGTCACTGCA	GTAGGGAATC	550
AGTTTAACGG	AGGATGTTTG	TTGGTGGCCA	TGGTGCCTGA	ACTTTGCTCC	600
ATTGACAAGA	GAGAGCTGTA	CCAGCTCACG	CTCTTTCCCC	ATCAGTTCAT	650
CAATCCCCGG	ACCAACATGA	CAGCACACAT	TACTGTGCCC	TTTGTGGCG	700
TCAACCGCTA	CGACCAGTAC	AAGGTTTACA	AACCTTGGAC	CCTCGTGGTC	750
ATGGTCGTGG	CTCCGCTGAC	TGTCAACACC	GAGGGTGCCC	CGCAGATCAA	800
GGTCTATGCC	AACATTGCCC	CTACCAACGT	GCACGTTGCG	GGTGAGTTCC	850
CTTCCAAGGA	A				861

2017

<210> 2
 <211> 1359
 <212> ADN
 <213> Trình tự VP1-2A-VP3 của Picornaviridae
 <220>
 <223>

<220>
 <400> 2

ACCACCTCCA	CAGGTGAGTC	GGCCGATCCC	GTTACTGCCA	CTGTTGAGAA	50
CTACGGTGGC	GAGACACAGG	TCCGGAGACG	CCAACACACG	GATGTCTCTT	100
TCATATTAGA	CAGATTTGTG	AAAGTAACAC	CAAAGACCA	AATTAATGTG	150
TTGGACCTGA	TGCAAACCCC	CGCGCACACC	TTGGTGGGAG	CGCTCCTCCG	200
CACTGCCACC	TACTACTTCG	CAGATTTAGA	AGTGTCAGTG	AAACACGAGG	250
GGAACCTCAC	CTGGGTCCCA	AACGGGGCGC	CTGAGACGGC	GTTGGACAAC	300
ACCACCAACC	CAACGGCCTA	CCACAAGGCA	CCGCTCACCC	GACTTGCACT	350
ACCCTACACG	GCACCGCACC	GTGTTCTGGC	TACTGTTTAC	AACGGGGGCT	400
GTAGGTACGG	CGCGAGCCCC	GTGACCAACG	TGAGGGGTGA	CCTACAAGTG	450
TTGACCCCGA	AGGCGGCAAG	AACGCTGCCC	ACCTCCTTCA	ACTACGGTGC	500
CATCAAAGCC	ACTCAGGTGA	CTGAACTGCT	TTACCGCATG	AAGAGGGCCG	550
AAACATACTG	CCCCCGGCCT	CTTTTGGCCA	TCCACCCGAG	TGAAGCTAGA	600
CGCAAGCAAA	AGATTGTGGC	ACCTGTGAAA	CAGCTTTTGA	ACTTTGACCT	650
GCTCAAGTTG	GCAGGAGACA	TCGAGTCCAA	CCCTGGGCCA	GGGATCTTTC	700
CCGTGGCATG	CAGCGACGGC	TACAGTGGCC	TGGTGACCAC	TGACCCAAAG	750
ACGGCTGACC	CCGCCTATGG	GAAAGTGTAC	AACCCACCTC	GCAACATGTT	800
GCCAGGgCGG	TTCACCAACT	TCCTAGATGT	GGCTGAGgCG	TGTCCTACGT	850
TTTTGCGCTT	TGCGGGTGGC	GTGCCGTACG	TGACCACAAA	GACAGACTCA	900
GACAGGGTAC	TCGCTCAGTT	CGACTTGTCT	TTGGCAGCAA	AACACATGTC	950
AAACACCTTC	CTGGCAGGTC	TCGCCCAGTA	CTACACACAG	TACAGCGGCA	1000
CCATCAACCT	ACACTTCATG	TTCACAGGCC	CCACTGACGC	GAAAGCGCGT	1050
TACATGATTG	CATACGCCCC	TCCTGGCATG	GAGCCGCCCA	AAACACCCGA	1100
GGCGGCTGCT	CACTGTATTC	ATGCGGAGTG	GGACACAGGG	TTGAATTCAA	1150
AATTCACATT	CTCAATCCCT	TACCTCTCTG	CGGCTGACTA	CGCGTACACC	1200
GCGTCTGACA	CTGCGGAGAC	CACAAACGTA	CAGGGATGGG	TTTGCCTGTT	1250
TCAAATCACA	CACGGGAAGG	CTGATGGCGA	CGCGTTGGTC	GTCCTAGCCA	1300
GCGCTGGCAA	GGA CTTCGAA	CTGCGTCTGC	CGGTTGACGC	TCGCACGCAG	1350
TAGTAATGA					1359

<210> 3
 <211> 897
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>

<220>

<400> 3

ATGAACACAG	GCTCAATTAT	CAACAACACTAC	TACATGCAGC	AATACCAGAA	50
CTCAATGGAC	ACGCAACTCG	GAGACAACGC	GATTCGGGT	GGCAGTAACG	100
AGGGCTCGAC	AGATAACCACT	AGTACGCACA	CAACGAACAC	CCAGAACAAC	150
GACTGGTTCT	CTAAGCTCGC	ATCCAGCGCG	TTCTCAGGCT	TGTTTCGGTGC	200
TCTGCTGGCT	GATCGCAAAA	CTGAGGAAAC	CACTTTGCTG	GAGGACCGCA	250
TCCTGACAAC	GCGTAACGGA	CACACCACTA	GTACAACGCA	GTCTTCAGTC	300
GGAGTACTT	ACGGTTACGC	TACAGCCGAA	GACTTCGTCT	CCGGTCCTAA	350
CACCCCGGA	CTGGAGACCA	GGGTTACTCA	AGCTGAAAGA	TTCTTCAAGA	400
CGCACCTCTT	CGACTGGGTG	ACCTCCGATC	CATTCGGTAG	ATGCTACCTG	450
CTGGAGCTGC	CGACTGACCA	TAAAGGTGTC	TACGGCTCCT	TGACAGATAG	500
CTACGCATAC	ATGCGCAACG	GTTGGGACGT	GGAAGTCACT	GCTGTGGGCA	550
ACCAATTCAA	CGGAGGTTGC	CTGCTCGTGG	CTATGGTCCC	TGAGCTGTGT	600
AGCATTGATA	AGCGCGAACT	CTACCAGTTG	ACGCTGTTCC	CACACCAATT	650
CATCAACCCG	CGTACAAACA	TGACGGCCCA	TATTACTGTG	CCATTCGTTG	700
GCGTGAACCG	TTACGACCAG	TACAAGGTCC	ACAAACCGTG	GACATTGGTG	750
GTCATGGTTG	TGGCTCCTCT	GACCGTTAAC	ACTGAAGGAG	CCCCCAAAT	800
CAAGGTGTAC	GCAAACATTG	CGCCTACCAA	CGTCCATGTT	GCTGGAGAGT	850
TCCCCTCAA	AGAATAATAA	TAA			873

<210> 4

<211> 1388

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<220>

<400> 4

ATGACGACCA	GCACAGGAGA	ATCAGCAGAT	CCGGTTACAG	CGACGGTTGA	50
AAACTACGGT	GGAGAGACGC	AAGTCCGCAG	ACGCCAGCAC	ACCGACGTGT	100
CCTTCATCCT	CGATAGGTTC	GTAAAGTGA	CTCCTAAAGA	CCAGATTAAC	150
GTGCTCGATT	TGATGCAAAC	CCCAGCTCAC	ACTCTGGTCG	GCGCGCTGCT	200
CAGAACCGCT	ACTTACTACT	TCGCCGACTT	GGAGGTCTCC	GTAAAGCATG	250
AAGGCAACCT	GACATGGGTC	CCAAACGGAG	CCCCGGAGAC	GGCACTGGAT	300
AACACCACTA	ACCCTACCGC	GTACCACAAG	GCTCCCCTCA	CACGCCTGGC	350
ACTCCCTTAC	ACGGCACCAC	ATCGTGTGTT	GGCAACTGTC	TACAACGGTG	400
GTTGCCGCTA	CGGTGCCAGC	CCAGTGACTA	ACGTCAGAGG	TGACCTGCAA	450
GTGCTCACAC	CAAAGGCTGC	CCGCACACTG	CCGACGTCTT	TCAACTACGG	500
AGCCATCAAG	GCAACCCAAG	TCACTGAGTT	GCTGTACAGG	ATGAAAAGAG	550

2017

CTGAAACCTA	CTGTCCACGT	CCGCTCTTGG	CTATCCACCC	ATCAGAGGCC	600
CGCCGTAAGC	AGAAAATTGT	TGCTCCGGTG	AAGCAACTGC	TCAACTTCGA	650
CTTGCTGAAA	TTGGCCGGTG	ACATCGAAAG	TAACCCTGGC	CCCGGAATTT	700
TCCCAGTCGC	CTGCTCCGAC	GGTTACAGCG	GCCTGGTTAC	AACGGACCCA	750
AAGACCGCTG	ACCCTGCTTA	CGGAAAAGTT	TACAACCCTC	CCCGCAACAT	800
GCTGCCAGGT	CGTTTCACGA	ACTTCCTCGA	CGTCGCCGAG	GCATGTCCTA	850
CATTCCTGCG	CTTCGCTGGA	GGTGTCCCCT	ACGTTACCAC	TAAGACAGAC	900
TCGGATCGTG	TGCTCGCCCA	GTTTCGATTTG	TCGCTGGCAG	CGAAACACAT	950
GTCCAACACC	TTCTTGGCCG	GACTGGCACA	GTACTIONACC	CAATACTCCG	1000
GTACTATCAA	CCTGCATTTT	ATGTTTCACAG	GCCCAACGGA	CGCGAAGGCT	1050
AGGTACATGA	TTGCCTACGC	ACCACCAGGA	ATGGAGCCTC	CAAAAACCCC	1100
TGAAGCTGCC	GCACACTGCA	TCCATGCTGA	GTGGGACACC	GGACTIONACT	1150
CTAAGTTCAC	TTTCTCAATT	CCTTACTTGA	GTGCGGCTGA	CTACGCGTAC	1200
ACAGCTTCCG	ATACGGCCGA	AACAACGAAC	GTTCAGGGTT	GGGTGTGTCT	1250
GTTCCAAATC	ACTCACGGAA	AGGCCGACGG	TGACGCACTC	GTGGTCTTGG	1300
CGTCTGCTGG	CAAAGACTTC	GACTIONCAGGT	TGCCCGTGGA	TGCTAGAACC	1350
CAATAATAAT	AA				1362

<210> 5

<211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<220>

<400> 5

AACACTGGGAGCATCATTAACAAC

<210> 6

<211> 21

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<220>

<400> 6

GCGGGTGAGTTCCTTCCAAGGAA

<210> 7

<211> 38

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<220>

<400> 7

gcgcgcgatccATGACCACCTCCACAGGTGAGTCGGC

<210> 8

<211> 39

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<220>

<400> 8

CATCGAGTCCAACCCTGGGCCATAGTAATGAaagcttgc