

TẠO DÒNG BÈO TẮM CHUYỂN GEN KHÁNG NGUYÊN VP2 VÀ BƯỚC ĐẦU THỬ NGHIỆM GÂY ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH TRÊN GÀ

Lê Huy Hàm¹, Trần Duy Dương¹, Phạm Thị Lý Thu¹, Lê Thị Kim Xuyên², Vũ Văn Tiến¹, Nguyễn Thị Khánh Vân¹, Lê Thanh Hòa²

¹Viện Di truyền nông nghiệp

²Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

VP2 là gen kháng nguyên có khả năng ứng dụng rất rộng làm vaccine thể hệ mới và khả năng linh hoạt được thiết kế trong chiến lược vaccine phòng chống bệnh Gumboro. Các nghiên cứu trên thế giới trong thập niên vừa qua đã cho thấy tiềm năng ứng dụng của vaccine uống sản xuất thông qua hệ thống thực vật chuyển gen là rất lớn, không những góp phần giảm giá thành vaccine mà còn mở ra những triển vọng mới của việc ứng dụng CNSH thực vật trong nông nghiệp và y học. Gen kháng nguyên VP2 đã được chuyển vào bèo tấm *Wolffia australiana* thông qua chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* GV3101 mang vector pPAM-VP2. Bèo tấm *W. australiana* sau khi chuyển gen được sàng lọc trên môi trường chọn lọc chứa 30 mg/l geneticin. 20 dòng bèo *W. australiana* chuyển gen nhận được sau 4 chu kỳ chọn lọc đã được phân tích PCR. Sản phẩm khuếch đại cho thấy có 06 dòng mang gen VP2. Trong số đó, 02 dòng (WT5 và WT39) đã được nhân dòng tạo sinh khối cho các thí nghiệm đánh giá khả năng gây đáp ứng miễn dịch của bèo tấm chuyển gen VP2 trên gà bằng kỹ thuật ELISA. Kết quả bước đầu cho thấy 01 dòng bèo tấm chuyển gen VP2 (dòng WT5) có đáp ứng miễn dịch trên gà theo tiêu chuẩn của kit ELISA.

Từ khóa: *A. tumefaciens*, bèo tấm chuyển gen, đáp ứng miễn dịch, Gumboro, VP2

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh Gumboro là bệnh viêm túi bạch huyết nhiễm trùng (Infectious Bursal Disease -IBD) cấp tính do virus gây ra ở gà, chủ yếu là ở gà 2 - 6 tuần tuổi, với tỷ lệ chết và khả năng lây lan cao ở gà con. Tỷ lệ chết cao còn là hậu quả của suy giảm miễn dịch do virus gây ra và sự liên - tạp nhiễm các bệnh khác. Cũng do bị suy giảm miễn dịch, mọi chương trình vaccine phòng chống một số bệnh nguy hiểm khác ở gia cầm cũng bị ảnh hưởng, gây thiệt hại kinh tế lớn đối với gà nuôi công nghiệp (Lê Thanh Hòa, 1992; Nguyễn Tiến Dũng, 1996; Lê Thanh Hòa, 2003).

VP2 là protein vỏ của virus IBD, được mã hóa bởi đoạn gen có độ dài khoảng 1.300 nucleotide. VP2 có độ bảo tồn cao về thành phần nucleotide ở hai đầu 5' và 3' và thành phần amino acid, nhưng lại có một vùng khoảng gần 500 nucleotide ở chính giữa của gen rất thay đổi trong các chủng khác nhau, nên được gọi là vùng "siêu biến đổi". Vùng này quyết định tính độc lực và tính kháng nguyên của virus, do vậy, được chọn để so sánh, chẩn đoán, giám định và lập phả hệ các chủng virus cường độc Gumboro (Yamaguchi *et al.*, 1996; Scherbacova *et al.*, 1998; Jackwood *et al.*, 2008).

Các nghiên cứu trên thế giới trong thập niên vừa qua đã cho thấy tiềm năng ứng dụng của vaccine uống sản xuất thông qua hệ thống thực vật chuyển gen là rất lớn, không những góp phần giảm giá thành vaccine mà còn mở ra những triển vọng mới của việc ứng dụng công nghệ sinh học thực vật trong nông nghiệp và y học.

Viện Di truyền Nông nghiệp đã chuyển thành công gen kháng nguyên VP2 vào bèo tấm, sử dụng bèo tấm chuyển gen này làm nguồn vaccine cho gia cầm phòng chống bệnh Gumboro và đã thu được những kết quả đáng kể. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày một số kết quả bước đầu về việc tạo dòng bèo tấm chuyển gen VP2 và đánh giá khả năng gây đáp ứng miễn dịch ở gà ăn bèo tấm chuyển gen VP2 sử dụng phương pháp ELISA.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu cho nghiên cứu tạo dòng bèo tấm chuyển gen VP2

Dòng bèo tấm *Wolffia australiana* No. 7540 có nguồn gốc từ New Zealand do GS. Landolt E. (Viện Địa thực vật học, Học viện Liên bang Thụy Sĩ) cung cấp.

Chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* GV3101 mang vector nhị phân pPAM-VP2 chứa cấu trúc gen VP2 sử dụng cho chuyển gen vào bào tằm do ĐH Tổng hợp Bonn (Cộng hòa Liên bang Đức) cung cấp.

Mẫu gia cầm cho thí nghiệm gây đáp ứng miễn dịch

Giống gia cầm: gà Tam Hoàng 1 ngày tuổi với số lượng 40 con/1 lần thử nghiệm. Đàn gia cầm được nuôi 2 tuần trước khi tiến hành thí nghiệm.

Vật liệu cho kiểm tra protein bằng phương pháp ELISA

Mẫu huyết thanh gà: 51 mẫu (có ký hiệu) bảo quản lạnh. KIT chẩn đoán: "Infectious Brucella Disease Virus Antibody Test Kit" của IDEXX

Phương pháp

Phương pháp chuyển gen vào bào tằm *W. australiana* thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

Chuẩn bị dịch vi khuẩn lây nhiễm

Cây vi khuẩn *A. tumefaciens* từ đĩa thạch sang 5 ml môi trường YEB lỏng (pH 7,2), nuôi lắc 200 vòng/phút, 28°C qua đêm. Chuyển 1 ml dịch vi khuẩn sang 10 ml môi trường YEB lỏng (pH 5,6), bổ sung kháng sinh thích hợp và 200 µM AS, nuôi lắc 200 vòng/phút, 28°C qua đêm. Đo OD₆₀₀ dịch vi khuẩn lây nhiễm (OD₆₀₀ = 0,8 - 1,0).

Lây nhiễm bào - vi khuẩn

Cho 1 - 2 g bào *W. australiana* từ đĩa nuôi cấy đặc vào dịch vi khuẩn *Agrobacterium*, lây nhiễm trong điều kiện ly tâm chân không, thời gian 10 phút/lần × 2 lần, sau đó giữ ở nhiệt độ phòng 10 phút.

Đồng nuôi cấy

Chuyển mẫu bào sau khi lây nhiễm sang môi trường đồng nuôi cấy SH + 200 µM AS (không bổ sung sucrose). Thời gian đồng nuôi cấy 3 ngày trong điều kiện sáng ở 26°C,

Tái sinh bào đã chuyển gen

Sau khi đồng nuôi cấy, cấy chuyển bào sang môi trường SH + 2% sucrose + 250 µg/ml cefotaxim, nuôi sáng ở 26°C, thời gian 2 - 3 ngày. Tiếp tục cấy chuyển mẫu bào *Wolffia* đã chuyển gen sang môi trường mới (1 tuần/1 lần), nhân mẫu và cấy chuyển trong 4 - 6 tuần.

Chọn lọc bào chuyển gen

Cấy chuyển bào chuyển gen sang môi trường SH đặc + 2% sucrose + 30 mg/l Geneticin. Duy trì và cấy chuyển các dòng bào đã chuyển gen trên môi trường chọn lọc trong 4 - 6 chu kỳ (5 - 7 ngày/chu kỳ) để thu nhận đủ số lượng bào cho tách chiết DNA tổng số.

Phương pháp tách chiết DNA tổng số từ bào tằm

Chúng tôi sử dụng phương pháp tách chiết DNA tổng số của Đại học Tổng hợp Bonn (Cộng hòa Liên bang Đức). Dòng bào *W. australiana* được nghiền bằng cối lạnh cùng với 3 ml đệm chiết. Sau đó, mẫu được chuyển vào ống eppendorf và thêm vào 300 µl đệm SDS 20% rồi ủ ở 65°C trong 5 phút. Thêm 2 ml kaliacetat và ủ trong 2 phút trên đá rồi ly tâm 14000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C. Sau khi ly tâm chuyển dịch nổi sang ống eppendorf mới và bổ sung isopropanol (1:1) và ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Ly tâm mẫu 14000 vòng/phút trong 20 - 60 phút ở 4°C. Loại bỏ dịch nổi, thu và rửa tủa DNA 2 lần bằng cồn 70%. Sau đó hòa tan DNA trong đệm TE, lưu giữ ở -20°C.

Hóa chất tách chiết

Đệm chiết DNA (pH 8,0) gồm: 100 mM Tris, pH 8,0; 50 mM EDTA; 10 mM β-mercaptoethanol; 20% SDS; 5 M kaliacetat.

Phân tích PCR các dòng bào tằm chuyển gen

Gen VP2 được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi: 5'- CCAAGGAAGCCTGAGTGAAC - 3'; 5'- CTCTTGCCGACCATGACATC - 3'. Tổng thể tích phản ứng 20 µl gồm: 1 µl DNA (50 ng/1 µl), 0,3 µl of dNTPs, 2 µl đệm PCR (10X), 2,5 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl primer mỗi loại (25 pmol), 0,2 µl *Taq* polymerase, và 12 µl H₂O. Quy trình chạy PCR: 1 chu kỳ 95°C trong 5 phút; 32 chu kỳ tiếp theo: 95°C trong 1 phút, 64°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút; chu kỳ cuối 72°C trong 10 phút.

Phương pháp thí nghiệm gây đáp ứng miễn dịch trên gà con

- Chuẩn bị chuồng trại, địa điểm thí nghiệm

Chuẩn bị 6 ô chuồng, tiến hành khử trùng tiêu độc chuồng trại bằng Cloramine B 0,5% đảm bảo hợp vệ sinh.

Thí nghiệm được tiến hành tại Trại Thí nghiệm của Viện Công nghệ sinh học, Cổ Nhuế, Từ Liêm, Hà Nội.

- Chuẩn bị mẫu bào chuyển gen

Bào tẩm chuyển gen VP2 gồm 2 dòng do Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ tế bào thực vật - Viện Di truyền nông nghiệp tạo ra (dòng WT5 và WT39).

Lượng bào chuyển gen cần cho 01 lần thử nghiệm: mỗi dòng 210 g (trọng lượng tươi).

Các mẫu bào chuyển gen được nghiền nhỏ bằng cối chày sứ thành huyền dịch trước khi tiến hành cho gà ăn.

Mỗi con gà được ăn 10 g bào (tương đương 9 ml huyền dịch bào đã xử lý).

- Bố trí thí nghiệm

+ Gà thí nghiệm được chia thành 6 lô, mỗi lô 6 con:

Lô 1: Gà được ăn bào chuyển gen dòng WT5 một lần (vào lúc 2 tuần tuổi).

Lô 2: Gà được ăn bào chuyển gen dòng WT5 hai lần (vào lúc 2 tuần tuổi và 3 tuần tuổi)

Lô 3: Gà được ăn bào chuyển gen dòng WT39 một lần (vào lúc 2 tuần tuổi).

Lô 4: Gà được ăn bào chuyển gen dòng WT39 hai lần (vào lúc 2 tuần tuổi và 3 tuần tuổi).

Lô 5: Gà không ăn bào (Lô đối chứng).

Lô 6: Gà được ăn bào *Wolffia* thường (bào không chuyển gen).

Thí nghiệm được lặp lại 03 lần.

+ Trước khi cho gà ăn bào, tiến hành lấy máu của tất cả các con gà thí nghiệm, chất huyết thanh để kiểm tra và lựa chọn các con gà hoàn toàn khỏe mạnh, không bị nhiễm bệnh sử dụng làm gà thí nghiệm. Thu một số mẫu huyết thanh làm đối chứng.

+ 3 tuần sau khi cho ăn lần cuối tiến hành lấy máu chất huyết thanh để xác định hàm lượng kháng thể Gumboro bằng phản ứng ELISA.

+ Tiến hành mổ khám một số con để kiểm tra lâm sàng.

Thu mẫu huyết thanh gà và bảo quản lạnh. Các mẫu huyết thanh sau đó được làm xét nghiệm ELISA.

Sử dụng KIT chẩn đoán: "Infectious Brucella Disease Virus Antibody Test Kit" của IDEXX.

Quy trình chẩn đoán (theo quy trình của KIT)

- Chuẩn bị mẫu

Pha huyết thanh: pha loãng huyết thanh với tỷ lệ 1/500.

Đĩa ELISA đã được phủ kháng nguyên, để ở nhiệt độ phòng trước khi sử dụng 30 phút.

- Cách tiến hành

Nhỏ mẫu dương chuẩn và âm chuẩn vào giếng (mỗi mẫu 2 giếng) với lượng 100 μ l/giếng.

Nhỏ 100 μ l huyết thanh (pha loãng 1/500), mỗi mẫu 2 giếng, ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng.

Rửa đĩa 3 lần với nước cất hoặc nước khử ion.

100 μ l Conjugate/giếng, ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng.

Rửa đĩa 3 lần bằng nước cất hoặc nước khử ion.

Cơ chất (substrate), 15 phút ở nhiệt độ phòng.

Dừng phản ứng.

Đọc đĩa ELISA bằng máy đọc ELISA reader-BIORAD với bước sóng 650 nm.

Phân tích kết quả (theo quy trình của KIT)

Các mẫu dương có giá trị S/P > 0,2

Các mẫu âm có giá trị S/P < 0,2

Giá trị trung bình mẫu âm chuẩn: (Giá trị âm OD1+ Giá trị âm OD2)/2 = NCx

Giá trị trung bình mẫu dương chuẩn: (Giá trị dương OD1+ Giá trị dương OD2)/2 = PCx.

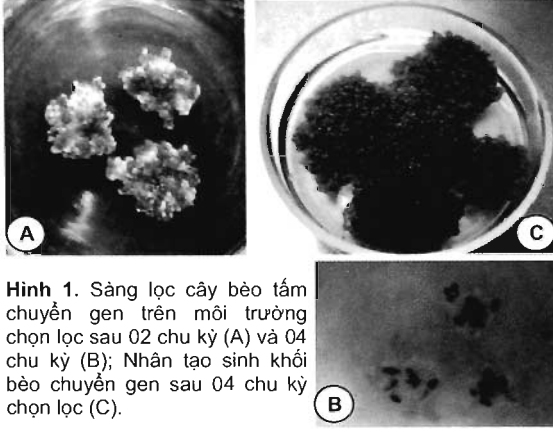
Tính giá trị hệ số: (giá trị OD trung bình - NCx)/(PCx-NCx) = S/P.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

Tạo dòng bào tẩm *W. australiana* chuyển gen VP2

Bào tẩm *W. australiana* nhân trên môi trường SH + 20 g/l sucrose được biến nạp với chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* GV3101pPAM-VP2. Bào sau biến nạp được đồng nuôi cấy trên môi trường SH + 200 μ M AS trong 3 ngày sau đó được chuyển lên môi trường SH + 250 mg/l cefotaxim + 20 g/l sucrose để loại bỏ vi khuẩn *Agrobacterium*. Môi trường chọn lọc bào tẩm gồm có nền khoáng SH + 30 mg/l geneticine + 20 g/l sucrose. Chúng tôi đã tiến hành 38 thí nghiệm

chuyển gen vào *W. australiana* với chủng GV3101pPAM-VP2, lượng mẫu 10 g bèo/thí nghiệm và đã nhận được 20 dòng bèo chuyển gen sau chọn lọc 2 chu kỳ. Cuối cùng, 06 dòng bèo chuyển gen đã sống sót và sinh trưởng tốt trên môi trường chọn lọc sau 4 chu kỳ (Hình 1). Những dòng bèo này được nhân lên với số lượng lớn, đủ mẫu cho tách chiết DNA và tiến hành phân tích PCR để kiểm tra sự có mặt của gen VP2 trong các cây bèo tằm đã chuyển gen.



Hình 1. Sàng lọc cây bèo tằm chuyển gen trên môi trường chọn lọc sau 02 chu kỳ (A) và 04 chu kỳ (B); Nhân tạo sinh khối bèo chuyển gen sau 04 chu kỳ chọn lọc (C).

Phân tích cây chuyển gen bằng phương pháp PCR

Tiến hành các phản ứng PCR sử dụng 20 mẫu DNA của bèo tằm chuyển gen làm khuôn và cặp mồi đặc hiệu cho khuếch đại gen VP2. Kết quả điện di các sản phẩm của phản ứng PCR thể hiện ở hình 2 cho thấy, trong số 20 mẫu DNA của bèo tằm chuyển gen được phân tích có 06 mẫu bèo chuyển gen có xuất hiện vạch DNA tại vị trí có kích thước ~604 bp gồm các dòng: WT1, WT3, WT5, WT28, WT39, WT40. Như vậy, từ 20 dòng bèo chuyển gen sau nhiều chu kỳ chọn lọc, chúng tôi đã nhận được 06 dòng với sự có mặt của gen VP2, các dòng này có khả năng sinh trưởng bình thường và tạo sinh khối tốt, tương tự như mẫu bèo tằm dạng tự nhiên (chưa được chuyển gen).

Kết quả phát hiện kháng thể kháng Gumboro bằng ELISA

Thu mẫu huyết thanh gà

Thí nghiệm được bố trí nhằm đánh giá khả năng gây đáp ứng miễn dịch của protein kháng nguyên VP2 được tạo ra trong cây bèo tằm chuyển gen trên

gà con với các mốc bắt đầu cho ăn bèo: 2, 3 tuần tuổi và số lần cho ăn là 1 hoặc 2 lần.

Chúng tôi đã thu được tổng số 51 mẫu huyết thanh tại các thời điểm và các lô thí nghiệm khác nhau. Cụ thể là:

Huyết thanh gà đối chứng: Gà 2 tuần tuổi (8 mẫu); Gà 3 tuần tuổi (4 mẫu); Gà 5 tuần tuổi (4 mẫu);

Huyết thanh gà 6 tuần tuổi ăn bèo không chuyển gen: 6 mẫu.

Huyết thanh gà 5 tuần tuổi (3 tuần sau ăn dòng WT5 một lần): 6 mẫu.

Huyết thanh gà 6 tuần tuổi (4 tuần sau ăn dòng WT5 một lần): 3 mẫu.

Huyết thanh gà 5 tuần tuổi (3 tuần sau ăn dòng WT39 một lần): 6 mẫu.

Huyết thanh gà 6 tuần tuổi (4 tuần sau ăn dòng WT39 một lần): 2 mẫu.

Huyết thanh gà 6 tuần tuổi ăn dòng WT5 hai lần: 6 mẫu.

Huyết thanh gà 6 tuần tuổi ăn dòng WT39 hai lần: 6 mẫu.

Các mẫu huyết thanh sau khi thu được bảo quản lạnh để làm xét nghiệm ELISA.

Kết quả phát hiện kháng thể kháng protein VP2 bằng ELISA

Mẫu huyết thanh gà được xét nghiệm bằng kỹ thuật ELISA sử dụng KIT chẩn đoán: “Infectious Brucella Disease Virus Antibody Test Kit” của IDEXX. Kết quả xét nghiệm được thống kê ở bảng 1.

Kết quả bảng 1 cho thấy tổng số 16 mẫu huyết thanh thu được từ 8 con gà đối chứng (không ăn bèo) ở các độ tuổi khác nhau (2, 3 và 5 tuần tuổi) (mẫu số 1 - 16) đều cho phản ứng âm tính. Mặt khác, 6 mẫu huyết thanh thu được từ 6 con gà được ăn bèo thường (bèo không chuyển gen) ở 6 tuần tuổi (mẫu số 17 - 22) cũng cho phản ứng âm tính. Như vậy, trong huyết thanh của các con gà này hoàn toàn không có kháng thể kháng protein VP2.

Trong số 51 mẫu huyết thanh thí nghiệm có 33 mẫu huyết thanh có phản ứng âm tính (chỉ số S/P < 0,2) và có tổng cộng 18 mẫu huyết thanh có phản ứng dương tính (chỉ số S/P > 0,2).

Trong số 18 mẫu dương tính thì có 7/9 mẫu dương tính của lô gà 6 con cho ăn bèo dòng WT5

một lần (mẫu số 23 - 25, 27, 29 - 31); 6/6 mẫu dương tính của lô gà 6 con cho ăn bèo dồng WT5 hai lần (mẫu số 40 - 44, 48); Trong khi đó, 08 mẫu huyết thanh thu được ở lô gà thí nghiệm cho ăn bèo dồng WT39 một lần thì chỉ có 02 mẫu cho phản ứng dương tính (mẫu số 35, 50); từ 6 mẫu huyết thanh của lô gà 06 con cho ăn bèo dồng WT39 hai lần thì có 3 mẫu dương tính (mẫu số 46, 49, 51);

Tóm lại, trên cơ sở phân tích mẫu huyết thanh dương tính, chúng tôi đã thu được kết quả như sau:

- Lô gà ăn bèo dồng WT5 một và hai lần: huyết thanh của 10/12 con có kháng thể kháng protein

VP2.

- Lô gà ăn bèo dồng WT39 một và hai lần: huyết thanh của 5/12 con có kháng thể kháng protein VP2.

Gà được ăn bèo chuyển gen với số lần nhiều hơn đã cho khả năng gây đáp ứng miễn dịch cao hơn.

Hơn nữa, dựa trên chỉ số S/P ta cũng có thể thấy lượng kháng thể kháng protein VP2 trong các mẫu huyết thanh cũng khác nhau đáng kể, dao động từ 0,235 - 0,645. Đánh giá mức độ tạo kháng thể kháng protein VP2 trong các mẫu huyết thanh của gà ăn bèo tằm chuyển gen được mô tả dưới đây (Bảng 2).

Bảng 1. Kết quả xét nghiệm ELISA trên các mẫu huyết thanh gà đã được gây đáp ứng miễn dịch.

Mẫu HT	OD1	OD2	OD tb	S	S/P	Mẫu HT	OD1	OD2	OD tb	S	S/P
P	0,203	0,205	0,204	0,164	0,82	30	0,083	0,081	0,082	0,042	0,21
N	0,05	0,04	0,045	0,005	0,025	31	0,16	0,161	0,1605	0,1205	0,6025
1	0,067	0,054	0,0605	0,0205	0,1025	32	0,075	0,077	0,076	0,036	0,18
3	0,108	0,108	0,108	0,068	0,14	33	0,073	0,062	0,0675	0,0275	0,1375
2	0,084	0,056	0,07	0,03	0,15	34	0,049	0,052	0,0505	0,0105	0,0525
4	0,074	0,073	0,0735	0,0335	0,1675	35	0,117	0,12	0,1185	0,0785	0,3925
7	0,078	0,07	0,074	0,034	0,17	36	0,055	0,053	0,054	0,014	0,07
9	0,077	0,083	0,08	0,04	0,2	37	0,057	0,061	0,059	0,019	0,095
10	0,05	0,051	0,0505	0,0105	0,0525	38	0,071	0,072	0,0715	0,0315	0,1575
11	0,051	0,048	0,0495	0,0095	0,0475	39	0,056	0,066	0,061	0,021	0,105
12	0,055	0,055	0,055	0,015	0,075	40	0,099	0,098	0,0985	0,0585	0,2925
13	0,056	0,055	0,0555	0,0155	0,0775	41	0,086	0,098	0,092	0,052	0,26
14	0,067	0,073	0,07	0,03	0,15	42	0,083	0,091	0,087	0,047	0,235
15	0,069	0,07	0,0695	0,0295	0,1475	43	0,111	0,105	0,108	0,068	0,34
16	0,08	0,074	0,077	0,037	0,185	44	0,082	0,087	0,0845	0,0445	0,2225
17	0,089	0,098	0,0935	0,0535	0,1675	8	0,066		0,066	0,026	0,13
18	0,069	0,07	0,0695	0,0295	0,1475	21	0,091		0,091	0,051	0,155
19	0,072	0,066	0,069	0,029	0,145	6	0,091		0,091	0,051	0,155
20	0,076	0,083	0,0795	0,0395	0,1975	5	0,053		0,053	0,013	0,065
22	0,09	0,084	0,087	0,047	0,135	45	0,072		0,072	0,032	0,16
23	0,146	0,147	0,1465	0,1065	0,5325	46	0,169		0,169	0,129	0,645
24	0,105	0,103	0,104	0,064	0,32	47	0,067		0,067	0,027	0,135
25	0,099	0,099	0,099	0,059	0,295	48	0,135		0,135	0,095	0,475
26	0,056	0,066	0,061	0,021	0,105	49	0,118		0,118	0,078	0,39
27	0,123	0,145	0,134	0,094	0,47	50	0,09		0,09	0,05	0,25
28	0,055	0,059	0,057	0,017	0,085	51	0,104		0,104	0,064	0,32
29	0,112	0,122	0,117	0,077	0,385						

Bảng 2. Đánh giá mức độ tạo kháng thể kháng protein VP2⁽¹⁾ trong các mẫu huyết thanh của gà ăn bèo tấm chuyển gen.

Mẫu HT	Gà ăn bèo dòng WT5		Gà ăn bèo dòng WT39		S/P
	1 lần	2 lần	1 lần	2 lần	
23					0.5325
24	+				0.32
25	+				0.295
27	++				0.47
29	+				0.385
30	+				0.21
31					0.6025
35			+		0.3925
40		+			0.2925
41		+			0.26
42		+			0.235
43		+			0.34
44		+			0.2225
46					0.645
48		+++			0.475
49				+	0.39
50			+		0.25
51				+	0.32

Ghi chú: 0,2 < S/P < 0,4: Mức độ tạo kháng thể kháng protein VP2 trung bình (+); 0,4 < S/P < 0,5: Mức độ tạo kháng thể kháng protein VP2 khá (++); 0,5 < S/P < 0,7: Mức độ tạo kháng thể kháng protein VP2 tốt (+++).



Hình 2. Phân tích PCR các dòng *W. australiana* chuyển gen. M. Thang DNA chuẩn 1 kb; 1. Đối chứng dương tính (DNA plasmid pAM-VP2); 2. Mẫu *W. australiana* đối chứng âm tính (không chuyển gen); 3, 8. Các dòng *W. australiana* chuyển gen không mang gen VP2; 4 - 7, 9, 10. Các dòng *W. australiana*.

KẾT LUẬN

Từ những kết quả thu được, chúng tôi đưa ra một số kết luận như sau: (i) Đã tạo được 06 dòng bèo tấm *Wolffia australiana* chuyển gen VP2. Sự có mặt

của gen kháng nguyên VP2 đã được phân tích bằng phản ứng PCR và (ii) Bước đầu đã đánh giá được khả năng gây đáp ứng miễn dịch của 02 dòng bèo tấm chuyển gen VP2 trên gà. Bèo tấm chuyển gen VP2 dòng WT5 có đáp ứng miễn dịch theo tiêu

chuẩn của kit ELISA và bèo chuyên gen VP2 dòng WT39 không có đáp ứng miễn dịch.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện trong khuôn khổ đề tài thuộc Chương trình Nhiệm vụ hợp tác nghiên cứu theo nghị định thư giữa Viện Di truyền Nông nghiệp và Viện Sinh lý phân tử và Công nghệ Sinh học, Đại học Tổng hợp Bonn, Cộng hòa Liên bang Đức.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Jackwood DJ, Sreedevi B, Lefever LJ, Sommer-Wagner SE (2008) Studies on naturally occurring infectious bursal disease viruses suggest that a single amino acid substitution at position 253 in VP2 increases pathogenicity. *Virology* 377(1): 110-116.

Lê Thanh Hòa (1992) *Bệnh Gumbô rô, suy giảm miễn dịch ở gia cầm*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.

Lê Thanh Hòa (2003) *Sinh học phân tử Gumboro, nghiên cứu ứng dụng tại Việt Nam*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.

Nguyễn Tiến Dũng (1996) Nhìn lại bệnh Gumboro ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y* 3(1): 94-98.

Scherbacova LO, Lomakin AI, Borisov AV, Drygin VV, Gusev AA (1998) Comparative analysis of VP2 gene variable region of infectious bursal disease virus. *Mol Gen Microbiol Virol* 1: 35-40.

Yamaguchi T, Ogawa M, Inoshima Y, Miyoshi M, Fukushi H, Hirai K (1996) Identification of sequence changes responsible for the attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus. *Virology* 223: 219-223.

DEVELOPMENT OF TRANSGENIC DUCKWEED EXPRESSING VP2 ANTIGEN AND THE PRELIMINARY IMMUNOLOGICAL IN TEST CHICKENS

Le Huy Ham^{1,*}, Tran Duy Duong¹, Pham Thi Ly Thu¹, Le Thi Kim Xuyen², Vu Van Tien¹, Nguyen Thi Khanh Van¹, Le Thanh Hoa²

¹Institute of Agricultural Genetics

²Institute of Biotechnology

SUMMARY

VP2 is an antigenic gene that has had a very wide range utilized potential for producing a new generation of vaccine and actively designing way in vaccine strategy for combating gumboro disease. In the last decade, there are many researches from over the world have shown great applied potential of edible vaccines produced through transgenic plants. Not only they contribute to cost reduction, they opened up new prospects in applying plant biotechnology to agriculture, medicine and many aspects of life, also. The aim of this research is to regenerate transgenic duckweeds with VP2 as a transgene which can produce recombinant proteins as a vaccine. VP2 gene was transferred into *Wolffia australiana* by an *A. tumefaciens* GV3101 strain which contains pPAM-VP2 vector. After transformation, *W. australiana* plants were selected by placing onto a medium added 30 mg/l geneticine. Twenty transformation events of *Wolffia australiana* were obtained after four cycles of selection. These transformants were analyzed by PCR. PCR results reveal six lines had VP2 gene in their genome. WT5 and WT39 lines were then cultivated to reach biomass enough for feeding chickens whose serum then were used as samples for ELISA tests. Initial results proved that WT5 line has had immune responses in the chickens fed the line.

Keywords: *A. tumefaciens*, transgenic duckweed, immune response, Gumboro, VP2

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37542023; E-mail: lham@agi.ac.vn

