

## GIẢI TRÌNH TỰ VÀ PHÂN TÍCH TOÀN BỘ HỆ GEN CHỦNG VIRUS NHƯỢC ĐỘC HANVET1.VN SỬ DỤNG TRONG SẢN XUẤT VACCINE PHÒNG HỘI CHỨNG RỐI LOẠN SINH SẢN VÀ HÔ HẤP Ở LỢN

Nguyễn Thị Nga<sup>1</sup>, Hà Thị Thu<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Hoa<sup>3</sup>, Vũ Thị Hiền<sup>4</sup>, Trần Thị Thu Hiền<sup>4</sup>, Trần Văn Khánh<sup>4</sup>, Nguyễn Thanh Ba<sup>4</sup>, Nguyễn Hữu Vũ<sup>4</sup>, Đồng Văn Quyền<sup>2</sup>, Tô Long Thành<sup>3</sup>, Đinh Duy Kháng<sup>2,✉</sup>

<sup>1</sup>Viện Kỹ thuật Hóa sinh và Tài liệu nghiệp vụ, Bộ Công an

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

<sup>3</sup>Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương, Cục Thú y

<sup>4</sup>Công ty Cổ phần dược và vật tư thú y Hanvet

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: khangvspt@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 16.6.2017

Ngày nhận đăng: 05.01.2018

### TÓM TẮT

Chủng virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV) nhược độc Hanvet1.VN đã được phát triển bởi Công ty cổ phần dược và vật tư thú y (Hanvet) bằng phương pháp cấy truyền chủng HY-2010 trên tế bào Marc-145 sau 80 đời và đang sử dụng để sản xuất vaccine PRRS. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã giải mã và phân tích toàn bộ hệ gen chủng PRRSV Hanvet1.VN. RNA tổng số được tách chiết từ chủng Hanvet1.VN, sử dụng RT-PCR khuếch đại 15 phân đoạn riêng rẽ của toàn bộ hệ gen. Các đoạn gen sau khi khuếch đại được nhân dòng vào vector pCR2.1 và xác định trình tự bằng phương pháp Sanger. Trình tự gen được phân tích bằng chương trình phần mềm BioEdit và DNA Star. Kết quả cho thấy, chủng Hanvet1.VN có protein GP5 tương đồng về trình tự amino acid là 100% so với chủng cường độc phân lập ở Quảng Nam (07QN) và 98% so với một chủng Trung Quốc (07NM). Tuy nhiên, protein GP5 này có độ tương đồng khá thấp so với chủng VR2332, chỉ đạt 87%. Các protein MP và NP có tính bảo thủ cao so với các chủng cường độc lưu hành ở Việt Nam và Trung Quốc, đều đạt 99-100%. Các protein còn lại đều có sự thay đổi so với chủng cường độc 07QN, dao động từ 1,2% ở NP1a đến 3,9% ở GP2. Tuy nhiên, sự tương đồng về trình tự amino acid của tất cả các protein chủng Hanvet1.VN nhược độc đều rất thấp nếu so sánh với chủng chuẩn PRRSV type II (chủng Bắc Mỹ VR2332), dao động từ 86,25% đến 97,7%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, chủng vaccine Hanvet1.VN nhược độc có đặc tính kháng nguyên sinh miễn dịch phòng hộ tương đồng cao so với chủng PRRSV lưu hành trong nước, gần gũi so với chủng lưu hành ở Trung Quốc nhưng có sự khác biệt khá xa so với chủng cổ điển type II Bắc Mỹ (VR2332). Vì vậy khi nhập vaccine, đặc biệt từ các nước Âu-Mỹ để dự phòng bệnh PRRS cũng nên xem xét cả nguồn gốc chủng PRRSV sử dụng trong sản xuất vaccine.

**Từ khóa:** Hanvet1.VN, vaccine PRRS, toàn bộ hệ gen, thay đổi amino acid, hiệu lực vaccine

### MỞ ĐẦU

Hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome - PRRS) là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm trên lợn với mọi lứa tuổi. Bệnh do PRRSV gây ra với diễn biến bệnh phức tạp, khó khống chế, tỷ lệ mắc bệnh cao. PRRSV có kích thước nhỏ, có vỏ bọc và hệ gen là

RNA sợi đơn dương với độ dài khoảng 15 kb chứa 8 khung đọc mở, mã hóa cho 8 protein phi cấu trúc và cấu trúc: NSP1a, NSP1b, GP2, GP3, GP4, GP5, MP, NP. PRRSV là thành viên thuộc chi *Arterivirus*, họ Arteriviridae, bộ Nidovirales (Balasuriya, Snijder, 2008). Hiện tại, có hai chủng PRRSV đại diện với đặc tính kháng nguyên và trình tự hệ gen rất khác biệt nhưng triệu chứng lâm sàng lại rất giống nhau là

chủng Châu Âu Lelystad (LV) và chủng Bắc Mỹ VR-2332. Ở Việt Nam các chủng PRRSV lưu hành phổ biến là chủng Bắc Mỹ. Đã có nhiều loại vaccine được sản xuất để phòng dịch bệnh, trong đó có vaccine PRRS nhược độc đang được ưu tiên sử dụng ở Trung Quốc và Việt Nam bởi tính bảo hộ cao hơn hẳn so với các loại vaccine khác. Chủng PRRSV nhược độc sử dụng trong sản xuất vaccine cần phải có tính an toàn và tính đặc hiệu kháng nguyên cao so với các chủng PRRSV đang lưu hành. Chủng

PRRSV nhược độc sử dụng trong sản xuất vaccine của Công ty Cổ phần Dược và vật tư Thú y (Hanvet) đã được phát triển từ chủng HY-2010 bằng phương pháp cấy truyền 80 đời trên tế bào Marc-145. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả giải mã và phân tích toàn bộ hệ gen chủng virus nhược độc Hanvet1.VN sử dụng trong sản xuất vaccine phòng hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn nhằm đánh giá những biến đổi di truyền liên quan tới độc lực và tính sinh miễn dịch của vaccine.

**Bảng 1.** Các cặp mồi dùng trong khuếch đại 15 đoạn thuộc hệ gen PRRSV chủng Hanvet1.VN.

TT	Tên	Trình tự (5'-3')	Số nu gắn	Tm ước tính (°C)	Kích thước sản phẩm (bp)
1	PRRSP1	CGTATAGGTGTTGGCTCTATGC	22	50	1124
	PRRSM1	ATTAACCTGCAGCCTCCGC	19		
2	PRRSP2	ACACTGTCCCTGAAGGCAACTGC	23	55	1244
	PRRSM2	CCCAGGGAGCACAACATCCC	20		
3	PRRSP3	AACAAAACCAACCGGGTCACCC	22	56	1217
	PRRSM3	CCGCCGAGTCGATGATGG	19		
4	PRRSP4	GCTTCCTCACAGACTGAATATGAGG	25	53	1105
	PRRSM4	CTGGCGAGTCAAACCTACAAGC	22		
5	PRRSP5	TGGCTGCTGGTTGGCTTTTGC	21	57	1031
	PRRSM5	GTTGGGAAATGCACAATCTGGACG	24		
6	PRRSP6	GTGCGCTAACCCGTTTGCCG	20	57	1041
	PRRSM6	GCCACATTACAAAACCTGGCCTGAGG	25		
7	PRRSP7	CTTGTCGGCGTTCACACGGG	20	56	896
	PRRSM7	GCTGCATTCTCATGTTGGACG	22		
8	PRRSP8	CCCTCGTATGAGACTCAATGACG	24	56	1238
	PRRSM8	CTTTAGTGGCTTCGGACTCAAAATCC	26		
9	PRRSP9	TGATGCATCTCCAAGTTACTTGC	24	54	1093
	PRRSM9	CAGGCCACCTCTCTTAGTCACTGC	24		
10	PRRSP10	ATCCACGCCTGCAATTGTCC	20	54	1189
	PRRSM10	GGTGGGCCGATGATGAACC	19		
11	PRRSP11	GCCTTGCTCCCTACCTGCAAAG	22	56	1115 bp
	PRRSM11	GCAACCAGCCGATCTGGCC	19		
12	PRRSP12	GCTAAACTCCCAGTAGAACTTGC	23	50	1164 bp
	PRRSM12	AAGAATATGATGATATCAACAATGG	25		
13	PRRSP13	TTACAAAATTGGCCAACTTTTGTGG	26	56	955 bp
	PRRSM13	CCGTGTAGCTGAAGGACAAGAACG	24		
14	PRRSP14	GGGTTTATGATACCGCCTGG	20	50	1267 bp
	PRRSM14	CCAGAAGAAAGTTGGTATATCTGG	24		
15	PRRSP15	CATTTACAGTTGATTTATAACTTAACG	27	48	1472 bp
	PRRSM15	GGTCGCCCTAATTGAATAGG	20		

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng vaccine nhược độc do công ty Cổ phần Dược và vật tư Thú y (Hanvet) cung cấp. Mẫu được ký hiệu Hanvet1.VN. Bộ Kit SuperScript™ First-StrDNA Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) được sử dụng để tổng hợp cDNA. Kit tách dòng gen: TA cloning Kit (Invitrogen). Bộ kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) dùng để giải trình tự gen. Các hóa chất dùng trong nghiên cứu sinh học phân tử có độ tinh khiết cao được cung cấp bởi các hãng Sigma, Merck, Invitrogen...

Thiết kế các cặp mồi khuếch đại toàn bộ hệ gen của PRRSV bằng RT-PCR dựa trên trình tự hệ gen của các chủng PRRSV genotype Bắc Mỹ lưu hành ở Việt Nam và khu vực với các số đăng ký FJ393456, FJ393457, FJ393458, FJ393459, FJ394029 và chủng vaccine nhược độc RespPRRS, số đăng ký AF066183. Sử dụng phần mềm GenDoc so sánh các trình tự hệ gen toàn phần của virus PRRS lưu hành ở Việt Nam với trình tự hệ gen toàn phần của PRRSV nhược độc chủng vaccine. Dựa vào những vùng bảo thủ trong hệ gen, chúng tôi thiết kế 15 cặp mồi nhằm khuếch đại 15 đoạn (mỗi đoạn khoảng 1 kb) toàn bộ hệ gen của chủng virus vaccine (Bảng 1).

RNA tổng số được tách chiết từ dịch tế bào Marc-145 chứa virus bằng phương pháp Trizol. Nồng độ RNA được xác định bằng máy NanoDrop. RNA được chuyển sang cDNA bằng enzyme phiên mã ngược Super Script™II Reverse transcriptase (Fermentas) ở nhiệt độ 50°C trong vòng 30 phút và tiền biến tính ở nhiệt độ 94°C trong vòng 2 phút. Tổng hợp DNA sợi kép bằng enzyme Platinum Taq DNA polymerase dựa trên sợi khuôn là cDNA. Phản

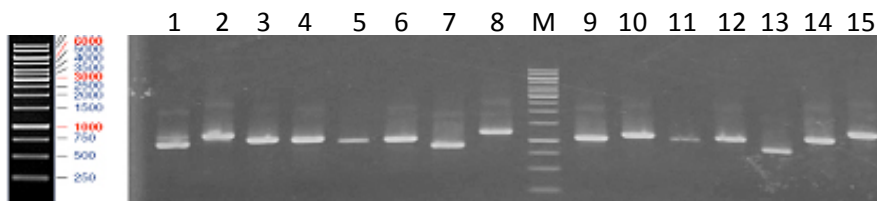
ứng PCR được tiến hành để khuếch đại các phân đoạn khác nhau của hệ gen PRRSV với mỗi cặp mồi tương ứng và chu kỳ nhiệt thích hợp là 94°C/3 phút (94°C/15 giây, 50°C- 50giây, 72°C/1phút 30 giây), lặp lại 30 chu kỳ các bước trong ngoặc đơn, 72°C/8 phút, bảo quản sản phẩm ở 4°C. Sau khi khuếch đại, sản phẩm PCR được tạo dòng bằng cách gắn trực tiếp vào vector tách dòng pCR2.1 với việc sử dụng bộ TA cloning Kit của hãng Invitrogen theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó, sản phẩm gắn được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng Top 10F<sup>+</sup> bằng phương pháp sốc nhiệt. Plasmid chứa các phân đoạn gen được tách chiết từ các khuẩn lạc trắng và kiểm tra các đoạn gen chèn bằng cắt với enzyme hạn chế *EcoRI*. Tinh sạch plasmid tái tổ hợp để phục vụ cho việc giải trình tự gen được thực hiện bằng bộ KIT S.N.A.P Miniprep Kit của hãng Fermentase. Phản ứng xác định trình tự được thực hiện nhờ bộ kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit của hãng Applied Biosystems, sử dụng hai mồi xuôi và ngược M13F và M13R. Xác định trình tự tự động trên hệ thống ABI 3100 và phân tích trình tự bằng phần mềm BioEdit và DNA Star.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Khuếch đại các phân đoạn thuộc hệ gen PRRSV bằng RT-PCR

Kết quả khuếch đại 15 đoạn thuộc hệ gen chủng Hanvet1.VN được trình bày ở hình 1.

Kết quả thể hiện ở hình 1 cho thấy, các đoạn gen được khuếch đại đặc hiệu, trên điện di đồ chỉ xuất hiện một băng duy nhất tương ứng với mỗi đoạn gen được khuếch đại, có kích thước phù hợp với dự tính theo lý thuyết.



**Hình 1.** Điện di gel agarose 1% kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại 15 đoạn gen thuộc hệ gen của chủng Hanvet1.VN. M: Marker DNA (DNA ladder Fermentase). Các đường chạy 1-15: Sản phẩm PCR với các cặp mồi từ 1 đến 15 khuếch đại các đoạn gen thuộc hệ gen chủng Hanvet1.VN nhược độc.

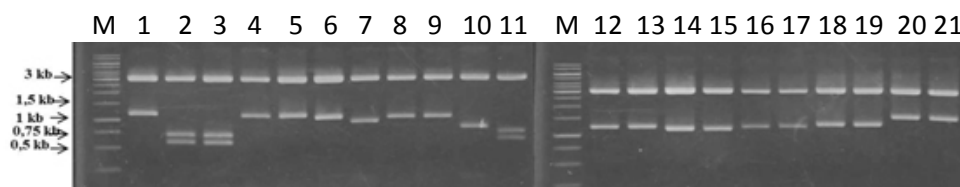
### Tách dòng các đoạn gen được khuếch đại bằng PCR

Kết quả kiểm tra các plasmid mang các đoạn gen tái tổ hợp được trình bày ở hình 2.

Kết quả trên hình 2 cho thấy, các dòng plasmid đều mang đoạn gen ngoại lai, thể hiện trên bản điện di tạo thành 2 băng rõ rệt, có kích thước tương ứng kích thước của vector và đoạn gen được chèn vào.

Tuy nhiên, plasmid ở đường chạy 2, 3 và 11 lại tạo thành 3 đoạn, 1 đoạn có kích thước của vector, 2 đoạn có kích thước khác nhau không tương ứng với kích thước của đoạn gen chèn vào. Điều này có thể

giải thích là trong đoạn gen chèn vào có vị trí cắt của enzyme *EcoRI*, vì vậy đoạn gen bị cắt thành hai mảnh nhỏ. Điều này sẽ được kiểm chứng sau khi giải trình tự và phân tích gen.



**Hình 2.** Điện di gel agarose 1% kiểm tra sản phẩm cắt các plasmid với enzyme hạn chế *EcoRI*. M: Marker DNA (DNA ladder Fermentase). Các đường chạy: 1: Plasmid gắn đoạn gen 1; 2-3: Plasmid gắn đoạn gen 2; 4-5: Plasmid gắn đoạn gen 3; 6: Plasmid gắn đoạn gen 4; 7: Plasmid gắn đoạn gen 5; 8-9: Plasmid gắn đoạn gen 6; 10: Plasmid gắn đoạn gen 7; 11: Plasmid gắn đoạn gen 8; 12: Plasmid gắn đoạn gen 9; 13: Plasmid gắn đoạn gen 10; 14-15: Plasmid gắn đoạn gen 11; 16-17: Plasmid gắn đoạn gen 12; 18: Plasmid gắn đoạn gen 13; 19: Plasmid gắn đoạn gen 14; 20-21: Plasmid gắn đoạn gen 15.

### Giải mã, lắp ráp và phân tích hệ gen chủng nhược độc Hanvet1.VN

Sau khi giải mã, lắp ráp và phân tích, chúng tôi thu được hệ gen của chủng Hanvet1.VN nhược độc có kích thước 15.276 bp, với 3306 A, 4036 C, 3995 G và 3939 T, tỷ lệ A+T chiếm 47,42%, G+C chiếm 52,68%. Phần không dịch mã đầu 5' có độ dài 185 nucleotide (1-185), phần không dịch mã đầu 3' có độ dài 110 nucleotide (15.167-15.276). Trình tự gen được đăng ký trên Ngân hàng gen với mã số KU842720. Sau khi dịch mã, toàn bộ hệ gen chủng Hanvet1.VN có 8 khung đọc, mã hóa cho 8 protein: Khung đọc ORF1a có độ dài 7.418 nucleotide (186-7607) mã hóa cho protein không cấu trúc NSP1a với độ dài 2473 amino acid. Khung đọc ORF1b có độ dài 4.377 nucleotide (7.597-11.974) mã hóa cho protein không cấu trúc NSP1b có độ dài 1.459 amino acid. Khung đọc ORF2 có độ dài 768 nucleotide (11.979-12.749) mã hóa cho protein GP2 có độ dài

256 amino acid. Khung đọc ORF3 có độ dài 765 nucleotide (12.602-13.366) mã hóa cho protein GP3 có độ dài 254 amino acid. Khung đọc ORF4 có độ dài 534 nucleotide (13.147-13.683) mã hóa cho protein GP4 có độ dài 178 amino acid. Khung đọc ORF5 có độ dài 600 nucleotide (13.694-14.296) mã hóa cho protein GP5 có độ dài 200 amino acid. Khung đọc ORF6 có độ dài 522 nucleotide (14.281-14.805) mã hóa cho protein MP có độ dài 174 amino acid. Khung đọc ORF7 có độ dài 372 nucleotide (14.795-15.166) mã hóa cho protein NP có độ dài 123 amino acid.

Để có thể phân tích các biến đổi di truyền so với chủng gốc hoang dại, chúng tôi đã chọn 3 chủng đại diện cho Việt Nam (07QN), Trung Quốc (07NM) và chủng PRRSV type Bắc Mỹ (VR2332) theo công bố của Feng *et al.*, (2008) để so sánh trình tự amino acid của tất cả 8 khung đọc. Kết quả so sánh sự tương đồng amino acid được khái quát ở bảng 2.

**Bảng 2.** Mức độ tương đồng về trình tự amino acid của tám protein chủng Hanvet1.VN so với các chủng đại diện Việt Nam 07QN, Trung Quốc 07MN và chủng PRRSV Bắc Mỹ VR2332.

	07QN (FJ394029)	07MN (FJ393456)	VR2332 (EF536003)
Hanvet_NP1a	98,79%	98,71%	86,25%
Hanvet_NP1b	98,77%	99,45%	96,57%
Hanvet_GP2	96,06%	96,88%	91,80%
Hanvet_GP3	96,85%	99,21%	86,61%
Hanvet_GP4	97,75%	96,63%	90,45%
Hanvet_GP5	100,00%	98,00%	87,00%
Hanvet_MP	100,00%	100,00%	97,70%
Hanvet_NP	99,19%	100,00%	94,31%

Kết quả phản ánh trong bảng 2 cho thấy, chủng Hanvet1.VN nhược độc có protein GP5 tương đồng 100% so với chủng cường độc phân lập ở Quảng Nam 07QN và 98% so với chủng Trung Quốc 07NM. Tuy nhiên, protein GP5 này có độ tương đồng khá thấp so với chủng VR2332, chỉ đạt 87%. Các protein MP và NP có tính bảo thủ cao so với các chủng cường độc lưu hành ở Việt Nam và Trung Quốc, đều đạt 99-100%. Các protein còn lại đều có sự thay đổi so với chủng cường độc, dao động từ 1,2% ở NP1a đến 3,9% ở GP2. Tuy nhiên, sự tương đồng về trình tự amino acid của tất cả các protein chủng Hanvet1.VN nhược độc đều thấp hơn nhiều nếu so sánh với chủng chuẩn PRRSV type II (chủng Bắc Mỹ VR2332), dao động từ 86,25% đến 97,7%.

## THẢO LUẬN

Sự xuất hiện các chủng PRRSV độc lực cao ở Trung Quốc vào những năm 2006-2007 đã gây ra hàng loạt các vụ dịch PRRS ở khu vực châu Á (Tian *et al.*, 2007). Vụ dịch PRRS làm chết hàng triệu lợn được bùng phát từ năm 2006 (Zhou, Yang, 2010). Các chủng PRRSV độc lực cao cũng gây ra các vụ dịch ở các nước khác ở khu vực châu Á. Trường hợp PRRS đầu tiên xuất hiện ở Việt Nam vào đầu năm 2007 (Feng *et al.*, 2008; Metwally *et al.*, 2010) sau đó lan sang các nước Đông Nam Á khác như Lào, Philippines, Cambodia v.v... (Jantafong *et al.*, 2015; Ni *et al.*, 2012; Tornimbene *et al.*, 2015). Để có thể phòng chống dịch bệnh, nhiều biện pháp tổng hợp đã được Bộ NN&PTNT chỉ đạo thực hiện, trong đó sử dụng vaccine là biện pháp được ưu tiên hàng đầu. Ngoài các loại vaccine nhập ngoại, các vaccine được nghiên cứu sản xuất trong nước cũng đã đóng góp phần quan trọng trong phòng chống dịch PRRS. Công ty cổ phần dược và vật tư thú y (Hanvet) đã nghiên cứu thành công trong việc tạo ra chủng PRRSV nhược độc (chủng Hanvet1.VN) và sử dụng chủng này để sản xuất vaccine phòng hộ chứng rồi loại hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS). Giải mã và phân tích hệ gen toàn phần của chủng Hanvet1.VN đã cung cấp các thông tin quan trọng cho việc đánh giá tính an toàn và tính sinh miễn dịch phòng hộ của vaccine. Kết quả so sánh trình tự amino acid tất cả 8 khung đọc của chủng nhược độc Hanvet1.VN với chủng đại diện lưu hành ở Việt Nam 07QN, lưu hành ở Trung Quốc 07MN và chủng PRRSV typ II Bắc Mỹ VR2332 cho thấy, protein GP5 tương đồng 100% so với chủng cường độc phân lập ở Quảng Nam 07QN và 98% so với chủng Trung Quốc 07NM. Tuy nhiên, protein GP5 này có độ tương

đồng khá thấp so với chủng VR2332, chỉ đạt 87%. Theo công bố của Popescu *et al.*, (2017), thì protein GP5 đóng vai trò quan trọng trong kích thích đáp ứng miễn dịch tạo kháng thể trung hòa PRRSV. Chính vì vậy sự tương đồng 100% về trình tự amino acid của protein GP5 chủng Hanvet1.VN nhược độc so với chủng đại diện lưu hành ở Việt Nam 07QN là thông tin quan trọng về sự tương đồng kháng nguyên tạo kháng thể trung hòa chống lại chủng PRRSV lưu hành ở Việt Nam. Các protein MP và NP ít biến đổi về trình tự amino acid. Trình tự amino acid của các protein MP và NP của chủng Hanvet1.VN hầu như không thay đổi so với chủng đại diện Việt Nam 07QN (100% và 99,2%) và Trung Quốc 07MN (100% và 100%). So với chủng chuẩn Bắc Mỹ type II VR2332 trình tự amino acid thay đổi nhiều hơn (97,7% và 94,3%), tuy nhiên so với các protein khác thì hai protein MP và NP vẫn là các protein ít biến đổi. Theo Shi *et al.* (2010), thì PRRSV được phân nhánh thành 9 dòng có sự khác biệt về đặc tính di truyền. Sự khác biệt về đặc tính di truyền, kháng nguyên cũng như đặc tính sinh học có thể gây ra sự khác biệt rất đáng kể trong các biểu hiện lâm sàng cũng như sự trầm trọng của bệnh ở lợn bị nhiễm trùng (Brockmeier *et al.*, 2012; Karniyuchuk *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2009). Sự tương đồng của các protein khác của chủng Hanvet1.VN dao động từ 96,88% ở GP2 đến 98,71% ở GP1a, nếu so sánh với chủng 07MN phân lập ở Trung Quốc năm 2007. Như vậy, giải mã toàn bộ hệ gen chủng nhược độc Hanvet1.VN đã tạo ra bộ cơ sở dữ liệu để đánh giá tương đồng amino acid với các chủng đang lưu hành và chủng cổ điển VR2332 nhằm ước đoán tính sinh miễn dịch cũng như theo dõi sự biến đổi di truyền của chủng giống trong quá trình sản xuất và sử dụng vaccine.

## KẾT LUẬN

Hệ gen chủng Hanvet1.VN nhược độc được xác định có chiều dài 15.276 nucleotide, gồm 8 khung đọc, mã hóa cho 8 protein phi cấu trúc và cấu trúc: NSP1a, NSP1b, GP2, GP3, GP4, GP5, MP, NP. Kết quả so sánh trình tự amino acid cho thấy, protein GP5 tương đồng 100% so với chủng 07QN và 98% so với chủng 07NM. Tuy nhiên, protein GP5 này có độ tương đồng khá thấp so với chủng VR2332, chỉ đạt 87%. Trình tự amino acid của các protein MP và NP của chủng Hanvet1.VN hầu như không thay đổi so với chủng 07QN (100% và 99,2%) và 07MN (100%), nhưng thay đổi nhiều hơn so với chủng Bắc Mỹ type II VR2332 (97,7% và 94,3%). Sự tương

đồng của các protein khác của chủng Hanvet1.VN dao động từ 96,9% ở GP2 đến 98,7% ở GP1a. Trình tự hệ gen chủng nhược độc Hanvet1.VN đã đăng ký trên Ngân hàng dữ liệu gen (GenBank) với mã số KU842720. Đây là cơ sở dữ liệu quan trọng để theo dõi sự biến đổi di truyền liên quan tới tính an toàn và tính sinh miễn dịch của chủng giống trong quá trình sản xuất và sử dụng vaccine.

**Lời cảm ơn:** Công trình được thực hiện với sự tài trợ kinh phí trong khuôn khổ đề tài nghiên cứu cấp cơ sở Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Balasuriya UBR, Snijder EJ (2008) Arteriviruses. In Mettenleiter TC, Sobrino F, eds. *Animal Viruses: Molecular Biology*. Caister Academic Press. Poole: 978.
- Brockmeier SL, Loving CL, Vorwald AC, Kehrl Jr, ME, Baker RB, Nicholson TL, Lager KM, Miller LC, Faaberg KS (2012) Genomic sequence and virulence comparison of four Type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains. *Virus Res* 169: 212–221.
- Feng Y, Zhao T, Nguyen T, Inui K, Ma Y, Nguyen TH, Nguyen VC, Liu D, Bui QA, To LT, Wang C, Tian K, Gao GF (2008) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus variants, Vietnam and China, 2007. *Emerg Infect Dis* 14: 1774–1776.
- Jantafong T, Sangtong P, Saenglub W, Mungkundar C, Romlamduan N, Lekchareonsuk C, Lekcharoensuk P (2015) Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Thailand and Southeast Asia from 2008 to 2013. *Vet Microbiol* 176: 229–238.
- Karniychuk UU, Geldhof M, Vanhee M, Van Doorselaere J, Saveleva TA, Nauwynck HJ (2010) Pathogenesis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate. *BMC Vet Res* 6: 30.
- Metwally S, Mohamed F, Faaberg K, Burrage T, Prarat M, Moran K, Bracht A, Mayr G, Berninger M, Koster L, To TL, Nguyen VL, Reising M, Landgraf J, Cox L, Lubroth J, Carrillo C (2010) Pathogenicity and molecular characterization of emerging porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Vietnam in 2007. *Transbound Emerg Dis* 57: 315–329.
- Ni J, Yang S, Bounlom D, Yu X, Zhou Z, Song J, Khamphouth V, Vatthana T, Tian K (2012) Emergence and pathogenicity of highly pathogenic Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Vientiane, Lao People's Democratic Republic. *J Vet Diagn Invest* 24:349–354.
- Tian K, Yu X, Zhao T, Feng Y, Cao Z, Wang C, Hu Y, Chen X, Hu D, Tian X, Liu D, Zhang S, Deng X, Ding Y, Yang L, Zhang Y, Xiao H, Qiao M, Wang B, Hou L, Wang X, Yang X, Kang L, Sun M, Jin P, Wang S, Kitamura Y, Yan J, Gao GF (2007) Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRSV in China and molecular dissection of the unique hallmark. *PLoS One* 2:e526.
- Tornimbene B, Frossard JP, Chhim V, Sorn S, Guitian J, Drew TW (2015) Emergence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome (HP-PRRS) in medium-scale swine farms in southeastern Cambodia. *Prev Vet Med* 118:93–103.
- Zhou L, Chen S, Zhang J, Zeng J, Guo X, Ge X, Zhang D, Yang H (2009a). Molecular variation analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China. *Virus Res* 145:97–105.
- Zhou L, Zhang J, Zeng J, Yin S, Li Y, Zheng L, Guo X, Ge X, Yang H (2009b) The 30-amino-acid deletion in the Nsp2 of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerging in China is not related to its virulence. *J Virol* 83: 5156–5167.
- Zhou L, Yang H (2010) Porcine reproductive and respiratory syndrome in China. *Virus Res* 154: 31–37.

## SEQUENCING AND ANALYSIS OF COMPLETE GENOME OF THE ATTENUATED HANVET1.VN STRAIN USED FOR VACCINE PRODUCTION AGAINST PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME

Nguyen Thi Nga<sup>1</sup>, Ha Thi Thu<sup>2</sup>, Nguyen Thi Hoa<sup>3</sup>, Vu Thi Hien<sup>4</sup>, Tran Thi Thu Hien<sup>4</sup>, Tran Van Khanh<sup>4</sup>, Nguyen Thanh Ba<sup>4</sup>, Nguyen Huu Vu<sup>4</sup>, Dong Van Quyen<sup>2</sup>, To Long Thanh<sup>3</sup>, Dinh Duy Khang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Chemical-Biology and Professional Documents, Ministry of Public Security*

<sup>2</sup>*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>3</sup>*National Center for Veterinary Diagnostics, MARD's Department of Animal Health*

<sup>4</sup>*Pharmaceutical and Veterinary Material J.S.C (HANVET)*

### SUMMARY

The porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) attenuated strain Hanvet1.VN has been developed by the Pharmaceutical and Veterinary Material J.S.C (HANVET) by passaging HY-2010 strain on MARC-145 cells for 80 passages and used for PRRS vaccine production. In this study, we sequenced and analyzed the whole genome of the attenuated Hanvet1.VN strain. The total RNA was extracted from the Hanvet1.VN strain, RT-PCR was used for amplification of 15 separate segments of the whole genome. The amplified segments were cloned into the pCR2.1 vector and sequenced by Sanger sequencing. The sequences were analyzed with BioEdit and DNA Star Software. The results showed that, GP5 of the Hanvet1.VN attenuated strain had 100% identity in amino acid (aa) sequences with one of the pathogenic Vietnamese strain isolated in Quang Nam Province and had 98% identity with that of the Chinese 07NM strain. However, the identity of aa sequence of the Hanvet1.VN GP5 was much lower in the comparison with GP5 of VR2332, and it was only 87%. The MP and NP proteins were highly conserved compared with pathogenic strains circulating in Vietnam (07QN) and China (07NM) (99-100%, respectively). The other eight proteins of the Hanvet1.VN strain showed changes from 1.2% in NP1a to 3.9% in GP2 compared with the 07QN strain. However, the aa identity of all Hanvet1.VN proteins were very low when compared with proteins of PRRSV type II strain (North American strain, VR2332), ranged from 86.25% to 97.7%. Our results showed that the Hanvet1.VN attenuated vaccine strain had protective immunogenicity similar to that strain circulating in Vietnam closely related to a strain from China but different from the type II North American strain VR2332. Hence, for importing PRRSV vaccine, especially from American or Europe Countries, antigenic compatibility of the PRRSV vaccine and strains circulating in Vietnam should be concerned in PRRSV vaccine production .

**Keywords:** *Attenuated Hanvet1.VN strain, PRRS vaccine, Genome sequence, amino acid change, vaccine safety and efficacy*