

NGHIÊN CỨU TẠO KHÁNG THỂ ĐƠN CHUỖI ĐẶC HIỆU KHÁNG NGUYÊN OMPA CỦA VI KHUẨN GÂY BỆNH VÀNG LÁ GÂN XANH TRÊN CÂY CÓ MÚI

Hồ Thị Thương¹, Nguyễn Thị Thơm¹, Nguyễn Thị Trà¹, Trịnh Thái Vy¹, Phạm Bích Ngọc¹, Lê Văn Sơn¹, Nguyễn Thị Bích Ngọc², Chu Hoàng Hà¹,✉

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Bảo vệ Thực vật, Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam

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

Ngày nhận bài: 08.11.2019

Ngày nhận đăng: 20.02.2020

TÓM TẮT

Bệnh vàng lá gân xanh hay còn gọi là HuangLongbing (HLB) được xem là một trong những bệnh hại nguy hiểm nhất trên cây ăn quả có múi. Bệnh làm hạn chế việc sản xuất cây ăn quả có múi ở khắp nơi trên thế giới. Phương pháp sản xuất kháng thể kháng protein Ompa của vi khuẩn *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) để phát hiện bệnh vàng lá gân xanh đang được xem là hướng nghiên cứu triển vọng. Trong nghiên cứu này, với mục đích sản xuất kháng thể đơn chuỗi kháng kháng nguyên Ompa của vi khuẩn CLAs, đầu tiên, chúng tôi sử dụng thư viện kháng thể nanobody (single variable domain, VHH) của Lạc đà để sàng lọc các kháng thể đơn chuỗi VHH kháng kháng nguyên Ompa bằng kỹ thuật bộc lộ phage M13 (phage-display). Tiếp đến, các dòng phage đơn 21, 33, 53, 56, 59 cho kết quả ELISA cao với kháng nguyên Ompa được lựa chọn để tách phagemid và đoạn gen mã hóa các kháng thể VHH được giải trình tự. Đoạn gen mã hóa cho kháng thể 53-VHH có ái lực với Ompa tốt nhất được lựa chọn và chèn vào vector biểu hiện pET-21a(+), sau đó nhân dòng trong chủng *E. coli* DH5α và biểu hiện trong chủng BL21 (DE3). Kháng thể đơn chuỗi 53-VHH kháng Ompa được tối ưu sự biểu hiện ở các nhiệt độ khác nhau (37 °C, 28 °C và 15 °C) với nồng độ cảm ứng IPTG 0,1 M. Kháng thể 53-VHH kháng Ompa được tinh sạch thành công dưới điều kiện biến tính, sau đó tái cuộn gấp. Hoạt tính sinh học của kháng thể đơn chuỗi 53-VHH kháng kháng nguyên Ompa được đánh giá bằng phản ứng ELISA gián tiếp. Kết quả cho thấy, kháng thể đơn chuỗi 53-VHH có tương tác rất tốt với kháng nguyên Ompa. Điều này mở ra triển vọng ứng dụng kháng thể đơn chuỗi 53-VHH trong việc phát hiện bệnh vàng lá gân xanh trên cây có múi.

Từ khóa: Bệnh vàng lá gân xanh, kháng thể đơn chuỗi VHH, thư viện Lạc Đà, kỹ thuật phage-display, vi khuẩn *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

GIỚI THIỆU

Bệnh vàng lá gân xanh hay còn gọi là HuangLongbing (HLB) được xem là một trong những bệnh hại nguy hiểm nhất trên cây ăn quả có múi. Bệnh làm hạn chế việc sản xuất cây ăn quả có múi ở khắp nơi trên thế giới (da Graca, 1991). Bệnh được do ba loài vi khuẩn (*Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) và

Candidatus Liberibacter americanus (Clam)) sống trong mạch dẫn của cây gây ra (Bové, 2006). Trong đó, bệnh vàng lá gân xanh gây ra do vi khuẩn CLAs phân bố ở khắp nơi trên thế giới. Vi khuẩn được lan truyền qua mắt ghép, cành chiết và qua côn trùng môi giới là rầy chổng cánh *Diaphorina citri* ở châu Á và rầy *Trioza erytrae* ở châu Phi (Gottwald *et al.*, 2007). Trong quá trình rầy ăn và sinh sống trên cây có múi, các tế bào vi khuẩn được đưa vào mạch rây

của cây và nhân lên trong đó (Gottwald, 2010). Vi khuẩn này gây ra sự xáo trộn sinh lý, làm tác nghẽn quá trình vận chuyển dinh dưỡng từ đó ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây. Cây bị bệnh sinh trưởng rất còi cọc; bộ lá, đặc biệt lá non, bị biến vàng; quả nhỏ, lệch, bị biến vàng phần cuống trước khi chín, không có giá trị sử dụng.

Hiện nay, chưa có phương pháp hiệu quả để cứu những cây bị nhiễm bệnh do CLAs gây ra. Các phương pháp pháp trừ bệnh chủ yếu dựa vào việc sử dụng vật liệu sạch bệnh, loại bỏ sớm cây bệnh, phòng chống vector và tạo giống kháng bệnh. Tất cả các chiến lược trên đều yêu cầu một kỹ thuật chẩn đoán chính xác nhưng chẩn đoán dựa trên triệu chứng rất khó vì biểu hiện không đặc trưng ở cây bị bệnh (Shen *et al.*, 2013). Các phương pháp để phát hiện cây bị nhiễm bệnh chủ yếu dựa vào phản ứng PCR và Realtime-PCR (Teixeira *et al.*, 2008), tuy nhiên phương pháp này tốn kém, chỉ sử dụng được trong phòng thí nghiệm và bị ảnh hưởng bởi sự phân bố thấp và không đồng đều của tế bào vi khuẩn CLAs trong cây bị nhiễm bệnh (Ding *et al.*, 2015; Arredondo Valdés *et al.*, 2016). Như vậy, cần một phương pháp thay thế để phát hiện trực tiếp CLAs trong cây có múi bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh.

Phương pháp dùng kháng thể để phát hiện protein của tác nhân gây bệnh được sử dụng rộng rãi trong chẩn đoán bệnh do hiệu quả cao và chi phí thấp. Những nghiên cứu gần đây cho thấy, kháng thể đa dòng kháng kháng nguyên Ompa protein của vi khuẩn CLAs đã phát hiện thành công vi khuẩn CLAs gây bệnh vàng lá gân xanh (Ding *et al.*, 2015, 2016, 2017). Ompa là một protein màng ngoài chính của vi khuẩn, với trình tự acid amin bảo thủ trong các loài *C. Liberibacter*. Kháng thể kháng Ompa có thể phát hiện tế bào CLAs trong mô mạch rây sử dụng phản ứng ‘tissue printing’ và cũng có thể được sử dụng để làm giàu các tế bào CLAs dựa vào tương tác kháng nguyên-kháng thể để tăng cường độ nhạy của PCR (Ding *et al.*, 2017). Tuy nhiên, kháng thể đa dòng tạo ra vẫn không thể phát hiện được các tế bào CLAs trong các cây bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh bằng phương pháp ELISA (Ding *et al.*, 2016).

Việc sản xuất kháng thể đơn chuỗi sử dụng thư viện kháng thể đơn chuỗi của Lạc đà được đặc biệt quan tâm do chúng có nhiều ưu điểm như cấu trúc đơn giản (có kích thước nhỏ ~ 75 kDa), có tính ổn định cao, có khả năng tan tốt, dễ dàng sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để cải biến theo các mục đích khác nhau, nhận biết được cả epitope đặc thù không thông dụng và các epitope bị che phủ, có khả năng liên kết vào vùng trung tâm hoạt động của enzyme và dễ dàng sản xuất trên quy mô lớn (Deffar *et al.*, 2009). Cấu trúc không gian của kháng thể đơn chuỗi của Lạc Đà gồm ba vùng hình cầu bao gồm vùng siêu biến VHH, vùng CH2, CH3. Cho đến nay, nhiều loại kháng thể đơn chuỗi được sàng lọc bằng kỹ thuật phage-display sử dụng thư viện kháng thể đơn chuỗi của Lạc Đà. Công nghệ này đã được ứng dụng rộng rãi trong chẩn đoán tác nhân gây bệnh cây, chủ yếu là virus. Thông qua sàng lọc từ thư viện kháng thể sẵn có, một loạt kháng thể (đoạn scFv) đã được xác định và có thể ứng dụng chẩn đoán nhiều tác nhân gây bệnh cây (Garnier *et al.*, 1991). Yuan và đtg (2016) đã sử dụng kháng thể đơn chuỗi scFv kháng một số kháng nguyên của vi khuẩn CLAs, tuy nhiên chỉ có kháng thể đơn chuỗi kháng kháng nguyên Ompa cho kết quả tốt nhất trong việc phát hiện mẫu bệnh vàng lá gân xanh bằng phản ứng ELISA. Tuy vậy, sự sai khác của giá trị OD450 trong phản ứng ELISA giữa mẫu bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh và mẫu khỏe là chưa lớn (Yuan *et al.*, 2016). Như vậy, cần có các nghiên cứu khác để tối ưu hiệu quả của kháng thể đơn chuỗi trong việc phát hiện bệnh vàng lá gân xanh bằng kỹ thuật ELISA.

Vùng siêu biến ở kháng thể Lạc Đà (VHH) còn gọi là nanobody rất được quan tâm nghiên cứu. Nanobody gồm đoạn trình tự cấu trúc liên kết trực tiếp với epitope kháng nguyên có kích thước nhỏ nhất (15 kDa) cuộn xoắn thành cấu trúc hình cầu với đường kính là 2,5 nm và dài khoảng 4 nm (Cortez-Retamozo *et al.*, 2004). Nanobody có nhiều ưu điểm nổi bật nhờ rất bền với nhiệt, có độ ổn định cao trong các chất tẩy, giữ được cấu trúc ổn định ở nồng độ ure cao và tan rất tốt trong nước. Nanobody đã được sản xuất thành công trong *E. coli*, nấm sợi (Joosten, 2005; Olichon, 2007),

dịch nổi và giữ lại 1 mL để hòa tan lại tế bào. Dung dịch được trải trên đĩa Bioassay đã chuẩn bị từ ngày 1 và nuôi qua đêm tại 37 °C.

Ngày 3: Tế bào được rửa từ đĩa BioAssay với 7 mL TY (2X, 15% glycerol) sử dụng que trải. 50 µl dịch khuẩn được bổ sung vào 20 mL TY (2X, 100 µg ampicillin, 1% glucose), dịch khuẩn được nuôi trong 1 h đến 2 h để OD đạt 0,4. Phần còn lại của dịch khuẩn sau khi rửa ở bước 1 được giữ tại -80 °C. Với 10 mL môi trường nuôi trên, bổ sung 5 µl helper phage (5×10^{10}). Hỗn hợp được ủ tại bể ổn nhiệt 37 °C trong 30 min không lắc. Cặn được thu bằng ly tâm ở 3700 rpm/min trong 10 min và hòa tan cặn trong 50 mL TY (2X, 100 µg ampicillin/mL, 50 µg kanamycin/mL). Dung dịch được ủ qua đêm tại 30 °C có lắc. Để tiếp tục các bước sàng lọc tiếp theo, thứ tự từ ngày 1 sẽ được lặp lại như trên.

Ngày 4: Môi trường nuôi qua đêm được thu bằng ly tâm ở 3700 rpm/min trong 15 min. Dịch nổi (40 mL) được thu lại, sau đó được bổ sung thêm 10 mL PEG/NaCl, trộn đều và cho dịch nổi lên đá trong 1 h để tủa phage. Dịch nổi được loại bỏ bằng ly tâm ở 3700 rpm/min trong 30 min. Dịch nổi tiếp tục được loại bỏ bằng ly tâm lần nữa. Cặn còn lại được hòa tan với 1 mL PBS và tiếp tục được ly tâm ở 11000 rpm/min trong 10 min. Dịch nổi thu được là phage sẽ được sử dụng cho bước sàng lọc tiếp theo. 400µl phage được thêm thêm vào 200 µl PBS (6% BSA), bắt đầu 3 vòng sàng lọc tiếp theo.

Ngày 5 đến 7: Các bước sàng lọc tiếp theo được thực hiện như miêu tả trên.

Ngày 8: Đĩa microtiter ở vòng sàng lọc 4 được sử dụng để phân lập các dòng phage đơn. Các dòng khuẩn đơn được lựa chọn từ đĩa microtiter trên và cho vào 100 µl TY (2X, 100 µg ampicillin/mL, 1% glucose) trên đĩa microtiter khác. Dung dịch được nuôi khuẩn qua đêm tại 37 °C với 500 rpm/min.

Ngày 9: 2 µl từ mỗi giếng microtiter được chuyển sang đĩa microtiter sạch có chứa 200 µl TY (2X, 100 µg ampicillin/mL, 1% glucose) mỗi giếng, lắc 700 rpm/min tại 37 °C trong 1 h. 25 µl môi trường TY (2X, 100 µg ampicillin/mL, 1%

glucose) chứa 10^9 helper phage được thêm vào dung dịch. Hỗn hợp được ủ ở 37 °C trong 30 min không lắc và sau đó 1 h cố lắc (300 rpm/min). Dịch nổi được loại bỏ bằng ly tâm tại 1500 rpm/min trong 10 min, sau đó cặn được hòa tan với 200 µl TY (2X, 100 µg ampicillin/mL, 50 µg kanamycin/mL), nuôi qua đêm 30 °C.

Ngày 10: Đĩa microtiter chứa dung dịch phage được ly tâm tại 1500 v/p trong 10 min. Dịch nổi thu được sẽ dùng cho phản ứng ELISA. Đĩa maxisorb được phủ với 100 µl kháng nguyên tái tổ hợp Ompa (10 ng/µl).

Ngày 11: Dịch chứa kháng nguyên trong đĩa maxisorb được loại bỏ, bổ sung 200 µl với 3% BSA trong PBS để phủ đĩa, đĩa được ủ trong 2 h ở nhiệt độ phòng. Dung dịch phủ được loại bỏ, sau đó thêm 100 µl phage (từ ngày 10) được pha loãng tỷ lệ 1+1 với 2% BSA trong PBS và ủ 1 h ở nhiệt độ phòng. Dung dịch phage được loại bỏ ra khỏi đĩa và đĩa được rửa 5 lần với PBS-T. 100 µl anti-M13-HRP được pha loãng trong PBS (1% BSA) với tỷ lệ 1:5000 được bổ sung vào đĩa và ủ đĩa tại 37 °C trong 1 h. Đĩa được rửa 5 lần với PBS-T và được bổ sung 100 µl dung dịch cơ chất TMB, chờ trong 15 min đến khi xuất hiện màu xanh. Phản ứng được dừng bằng cách bổ sung 50 µl sulphuric acid (1 M), màu xanh trên đĩa chuyển sang màu vàng. Kết quả ELISA được đọc ở bước sóng OD450.

Giải trình tự đoạn gen mã hóa kháng thể đơn chuỗi kháng Ompa

Các dòng kháng thể có ái lực tốt với kháng nguyên sẽ được lựa chọn để tách phagemid. Đoạn gen mã hóa các dòng kháng thể kháng Ompa được nhân lên và giải trình tự Sanger với cặp mồi PHEN/ LMB3. Trình tự đoạn DNA thu nhận được sau khi giải trình tự sẽ được xử lý và phân tích bằng phần mềm DNASTar và Bioedit.

Thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng thể đơn chuỗi VHH kháng kháng nguyên Ompa

Để gắn các đoạn gen mã hóa kháng thể kháng Ompa vào vector biểu hiện pET21a(+), các đoạn gen mã hóa kháng thể Ompa đã được nhân lên

bằng phản ứng PCR với các cặp mồi VHH-F/VHH-R có thêm các trình tự enzyme giới hạn *Bam*HI/*Sac*I. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch và xử lý bằng *Bam*HI và *Sac*I và gắn vào vector biểu hiện pET21a(+) đã được xử lý enzyme cắt giới hạn tương ứng trước đó. Sản phẩm gắn được biến nạp vào *E. coli* DH5 α và trải trên đĩa môi trường LB có bổ sung ampicillin 50 mg/mL. Để kiểm tra các plasmid tái tổ hợp, chúng tôi tiến hành phản ứng colony-PCR sử dụng cặp mồi VHH-F/VHH-R và phản ứng cắt với *Bam*HI và *Sac*I. Plasmid tái tổ hợp sau đó được biến nạp vào dòng tế bào khả biến *E. coli* BL21 (DE3) để biểu hiện kháng thể.

Biểu hiện kháng thể đơn chuỗi VHH kháng kháng nguyên Ompa

Để biểu hiện kháng thể đơn chuỗi kháng kháng nguyên Ompa, một khuẩn lạc chứa plasmid tái tổ hợp được nuôi trong 4 mL môi trường LB có bổ sung kháng sinh ampicillin 50 mg/mL ở 37 °C, nuôi lắc 200 rpm/min qua đêm. 2 mL dịch khuẩn được chuyển sang 200 mL môi trường LB có bổ sung kháng sinh ampicillin 50 mg/mL, nuôi ở 37 °C đến khi OD₆₀₀ đạt 0,4-0,6. Bình nuôi được bổ sung với 0,1 mM IPTG và nuôi lắc ở 200 rpm/min trong 5 h ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau: 37 °C, 28 °C, 15 °C. Cặn khuẩn được thu lại bằng ly tâm 6000 rpm, 20 min. Cặn khuẩn được bảo quản ở tủ -80°C.

Kiểm tra sự biểu hiện của kháng thể đơn chuỗi VHH kháng kháng nguyên Ompa bằng SDS-PAGE và Western blot

Để kiểm tra sự biểu hiện của kháng thể đơn chuỗi kháng kháng nguyên Ompa, cặn khuẩn từ 2 mL dịch khuẩn BL21 (DE3) tái tổ hợp trước và sau khi cảm ứng bằng IPTG được thu lại bằng ly tâm 10000 rpm, 2 min. Cặn khuẩn sau đó được bổ sung lysozyme 1 mg/mL, ủ trên đá trong 30 min, sau đó cặn khuẩn được siêu âm trong 10 min (42 kHz, 135 W). Dịch tan và pha cặn được phân tách bằng ly tâm 10000 rpm, 2 min. Protein từ các pha tan và pha cặn này được biến tính trong đệm SDS (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 0,1% (w/v), Bromophenolblue, 10% (v/v) Glycerol), ở 95 °C, 10 min. 30 μ g protein được phân tách bằng điện di SDS-PAGE (10%

polyacrylamide), sau đó protein được chuyển lên màng nitrocellulose bằng máy chuyển màng Fast blotter (Thermoscientific) ở 25V, 1,3A trong 20 min. Phản ứng Western blot được tiến hành theo phương pháp của Conrad và đtg (2011). Sau khi màng được khóa bằng sữa tách béo 5% pha trong PBS qua đêm, màng được ủ với kháng thể kháng cmyc trong 2 h. Tiếp đến màng được rửa ba lần với sữa 0.5% pha trong PBS, mỗi lần cách nhau 5 min. Sau đó màng được phủ với kháng thể chuột kháng IgG cộng hợp HRP trong 1 h. Sau đó, màng tiếp tục được rửa ba lần sữa 0.5% pha trong PBS, mỗi lần cách nhau 5 min và lần cuối với PBS. Sự có mặt của kháng thể kháng Ompa gắn cmyc trong mẫu được phát hiện nhờ phản ứng hiện màu bằng cơ chất DAB dưới sự có mặt của 0.04% H₂O₂.

Tối ưu tinh sạch kháng thể VHH đặc hiệu kháng kháng nguyên Ompa bằng phương pháp IMAC ở điều kiện biến tính

Cặn khuẩn chứa kháng thể được hòa tan trong đệm hòa tan (20mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 40 mM Imidazole, Urea 8M pH 7.4 GE), sau đó tiếp tục siêu âm 10 min (3s bật, 3s tắt). Dịch trong được thu bằng ly tâm 13000 rpm, 15 min. Dịch trong được ủ với Ni-sepharose (GE Healthcare, CHLB Đức) trong 2 h ở 4°C và được tinh sạch theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Toàn bộ hỗn hợp dịch được chuyển lên cột. Cột được rửa với 150 mL đệm rửa (20mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, Urea 8M, pH 7,4, GE Healthcare, CHLB Đức) với các nồng độ Imidazole 60 mM. Protein được hòa tan trong đệm ly giải cột (20mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazole, Urea 8M, pH 7,4, GE Healthcare, CHLB Đức). Dung dịch chứa protein tinh sạch sau đó được thẩm tích trong đệm PBS + 0.5M Urea + 1mM EDTA + 10% glycerol trong 2 h. Dung dịch tiếp tục thẩm tích qua đêm trong PBS + 10% glycerol + L-arginine. Protein tinh sạch trong túi thẩm tích được làm sạch lần nữa bằng ly tâm ở 10000 rpm, 3 min, sau đó toàn bộ dịch trong được chuyển lên cột cut off 9KDa, cột được ly tâm trong 2 h ở 4°C. Protein tinh sạch được bảo quản trong glycerol 50% ở tủ -80°C.

Kiểm tra ái lực của kháng thể VHH kháng kháng nguyên Ompa sau tinh sạch bằng phản ứng ELISA gián tiếp

Phản ứng ELISA gián tiếp được tiến hành theo quy trình sau được mô tả như sau: 100 µl kháng thể VHH được phủ trên đĩa (50 ng/giếng) qua đêm ở 4 °C. Đĩa được rửa 10 lần bằng PBS bổ sung 0.05% Tween20 (PBS-T). Các giếng được khóa bằng sữa 5% pha trong PBS pH 7,4 trong 2 h. Đĩa tiếp tục được rửa 10 lần trong PBS-T. Bổ sung 100µL/giếng kháng nguyên Ompa (có gắn đuôi his-tag) với các nồng độ khác nhau (10 ng, 20 ng, 40 ng, 80 ng, 160 ng/giếng) ở 4 °C, qua đêm. Đĩa tiếp tục được rửa 10 lần bằng PBS-T. Kháng thể kháng his-tag được pha loãng 1000 lần trong sữa 5% pha trong PBS, 2 h. Rửa đĩa 10 lần bằng PBS-T. Kháng thể chuột kháng IgG cộng hợp HRP được pha trong sữa 5% PBS và bổ sung vào giếng, ủ đĩa trong 1 h. Đĩa được rửa 10 lần bằng 0,5% sữa PBS-T. Đĩa tiếp tục được rửa 5 lần bằng 0,5% sữa trong PBS. 100 µl TMB được bổ sung vào đĩa, sau đó đĩa được ủ trong vòng 15-20 min trong tối. Phản ứng được dừng lại khi bổ sung 100 µl H₂SO₄ 1M. Kết quả được đo ở bước sóng OD450.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

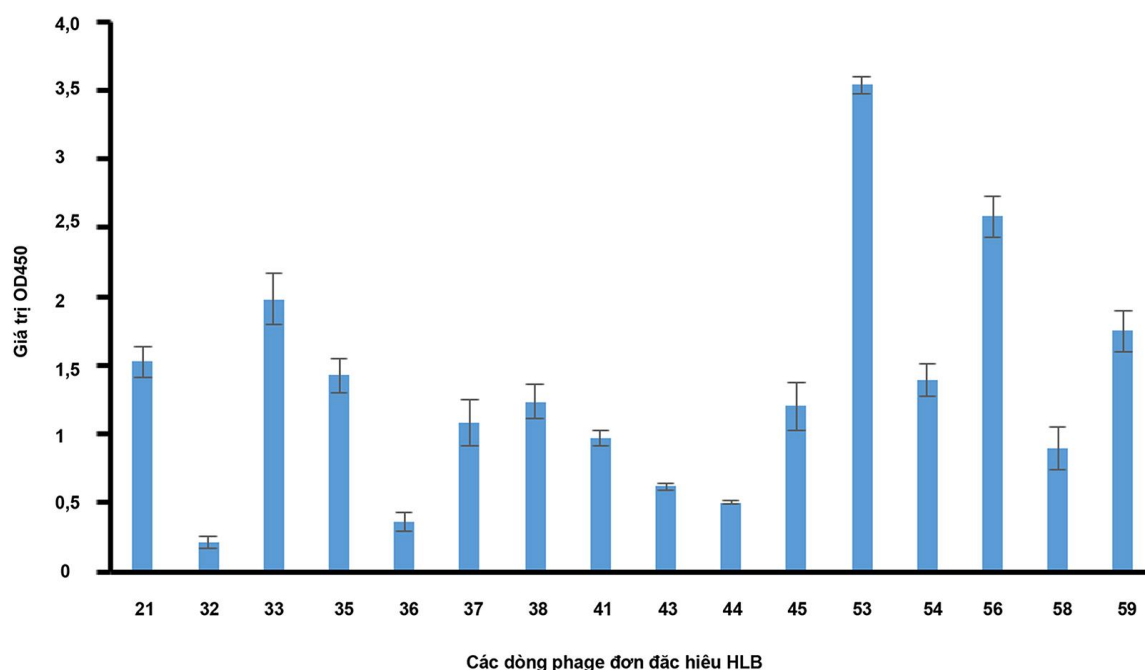
Sàng lọc các dòng kháng thể VHH kháng kháng nguyên Ompa bằng kỹ thuật phage-display

Thư viện phage Lạc đà VHH có chứa các đoạn kháng thể tổng hợp được tạo nên từ các vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH). Các đoạn VHH được dung hợp với protein vỏ pIT1 của thực khuẩn thể M13 để tạo thành thư viện các đoạn kháng thể VHH bộc lộ trên phage. Đầu tiên, kháng nguyên được cố định trong giếng. Tiếp theo, các dòng phage tái tổ hợp (phagemid), được tạo ra bằng cách nhiễm phage hỗ trợ (heper phage) vào các dòng vi khuẩn từ thư viện, được cố định vào giếng. Ở bước này, chỉ các dòng phage tái tổ hợp mang kháng thể đặc hiệu kháng nguyên mới liên kết với kháng nguyên tương

ứng. Các phage tái tổ hợp thừa bị loại bỏ qua bước rửa. Thông qua lặp lại các bước sàng lọc (thông thường 3-5 vòng), các phage tái tổ hợp đặc hiệu sẽ được thu thập. Khả năng gắn kết của hỗn hợp phage với kháng nguyên đích Ompa sau mỗi vòng sàng lọc được đánh giá bằng kỹ thuật ELISA.

Để sàng lọc các dòng phage đơn, hỗn hợp phage sau vòng sàng lọc 3 được xâm nhiễm vào *E. coli* chủng TG1, sau đó các khuẩn lạc đã được chọn được để thu phagemid. Phage thu được từ các khuẩn lạc riêng rẽ này dưới dạng từng dòng riêng biệt và được sử dụng cho thí nghiệm xác định khả năng gắn kết với kháng nguyên Ompa bằng phương pháp ELISA. Kháng nguyên Ompa được cố định trên khay ELISA 96 giếng, ủ mỗi giếng với dung dịch phage riêng biệt đã thu được. Các dòng phage sẽ gắn với tế bào đích thông qua đoạn kháng thể bộc lộ trên nó. Theo lý thuyết, dòng phage càng gắn tốt với kháng nguyên Ompa thì tín hiệu sẽ càng cao. Do đó, bằng kỹ thuật ELISA có thể định tính được độ nhạy của dòng phage thu được với kháng nguyên Ompa dựa trên số đo mật độ quang học. Kháng thể có khả năng gắn kết cao với kháng nguyên Ompa sẽ cho giá trị OD450 cao hơn và ngược lại. Hơn 100 dòng phage đơn được chọn lọc để đánh giá ái lực với kháng nguyên Ompa bằng phản ứng ELISA. Hình 1 thể hiện kết quả của 16 dòng khuẩn lạc đại diện sau khi đánh giá ái lực tương tác bằng phản ứng ELISA.

Kết quả nhận được cho thấy tất cả 16 dòng phage được chọn đều thể hiện khả năng gắn với kháng nguyên Ompa qua phản ứng ELISA. Trong đó, có 11 dòng phage đơn có giá trị OD450 trên 10. Đặc biệt, các dòng phage đơn 21, 33, 53, 56, 59 tín hiệu ELISA cao vượt trội so với các dòng phage đơn còn lại với giá trị OD450 trung bình sau 3 lần lặp lại lần lượt là 1,52; 1,98; 3,53; 2,58; 1,75. Trong số đó, dòng phage đơn 53 có giá trị OD450 cao nhất đạt 3,53. Từ kết quả trên, các dòng phage đơn 21, 33, 53, 56, 59 được tiến hành tách chiết phagemid phục vụ cho mục đích giải trình tự.



Hình 1. Kết quả của phản ứng ELISA đánh giá ái lực của hỗn hợp 16 dòng phage và dòng đối chứng sau vòng sàng lọc 3.

Giải trình tự gen mã hóa kháng thể đơn chuỗi VHH kháng kháng nguyên Ompa

Để giải trình tự đoạn gen mã hóa kháng thể VHH đặc hiệu kháng nguyên Ompa, phagemid của các dòng phage đơn trên được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi PHEN/LMB3. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi trên cho sản phẩm có kích thước khoảng 600 bp đúng với kích thước lý thuyết (597 bp) (Hình 2A). Sản phẩm PCR được tinh sạch và tiến hành giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Sau khi có kết quả giải trình tự, chúng tôi chọn dòng phagemid 53 để tiếp tục nghiên cứu. Trình tự amino acid của kháng thể VHH bao gồm các vùng CDR1, CDR2, CDR3 lần lượt được thể hiện bằng màu đỏ, màu xanh và màu tím ở Hình 2B.

Thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng thể VHH kháng kháng nguyên Ompa

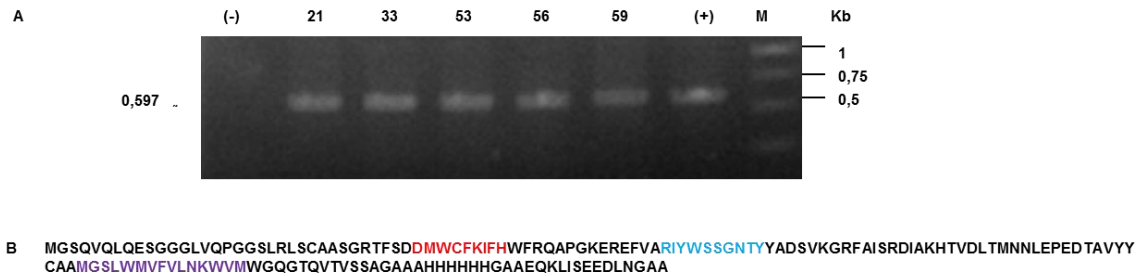
Đoạn gen mã hóa kháng thể 53-VHH được nhân lên và chèn vào vector biểu hiện pET21(a+) tại vị trí *Bam*HI và *Sac*I. Kết quả trên Hình 3 cho

thấy xuất hiện băng ở vị trí 500 bp tương ứng với gen mã hóa VHH kháng kháng nguyên Ompa, điều này chứng tỏ rằng đoạn gen mã hóa kháng thể 53-VHH đã được gắn thành công vào vector tái tổ hợp pET21(a+) tại vị trí enzyme cắt giới hạn *Bam*HI và *Sac*I. Các dòng *E. coli* tái tổ hợp tiếp tục được kiểm tra bằng phản ứng colony-PCR và xử lý bằng enzyme cắt giới hạn.

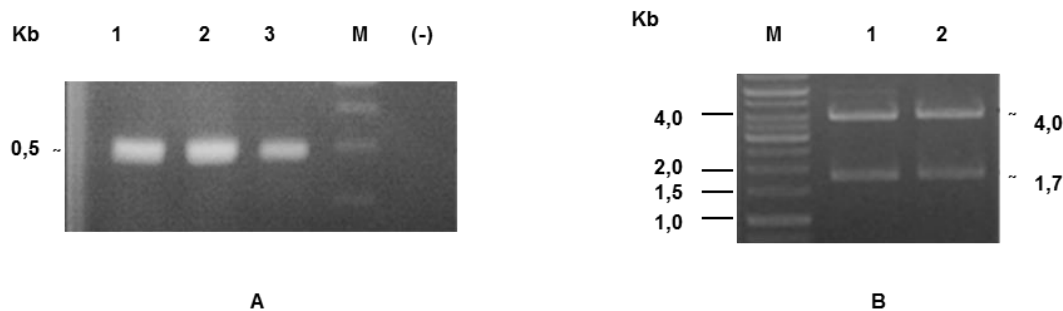
Kết quả phản ứng colony-PCR cho thấy, đoạn gen mã hóa cho kháng thể VHH đặc hiệu kháng nguyên Ompa đã được nhân lên đặc hiệu trong dòng tế bào *E. coli* DH5 α với đúng kích thước tính toán lý thuyết (Hình 3A). Sự có mặt của gen mã hóa kháng thể VHH trong plasmid tái tổ hợp số 1 và số 2 được kiểm tra bằng cách xử lý với *Xho*I và *Eco*RV. Kết quả điện di sản phẩm cắt cho thấy, cả hai dòng plasmid sau khi xử lý với enzyme cắt giới hạn đều cho ra hai băng có kích thước tương ứng là khoảng 4 kb và 1,7 kb tương ứng với kích thước tính toán lý thuyết (Hình 3B). Điều này chứng tỏ các plasmid được chọn đã mang gen VHH mong

muốn. Như vậy, vector biểu hiện pET-21a(+) mang gen mã hóa kháng thể đặc hiệu kháng

nguyên Ompa của vi khuẩn gây bệnh vàng lá gân xanh đã được thiết kế thành công.



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân gen mã hóa kháng thể kháng Ompa với cặp mồi PHEN/LMB3. 21, 33, 53, 56, 59: các dòng phage đơn, (-): đối chứng âm, (+): đối chứng dương sử dụng khuôn là phage đơn chứa VHH tái tổ hợp kháng RRSV (A) và trình tự acid amin của kháng thể đơn chuỗi kháng Ompa (B).màu đỏ: CDR1, màu xanh:CDR2, màu tím: CDR3



Hình 3. Kết quả thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng thể VHH kháng kháng nguyên Ompa (A) Kết quả colony-PCR với cặp mồi VHH-F/VHH-R. 1, 2, 3: các dòng khuẩn lạc, (-): đối chứng âm (B). Kết quả xử lý enzyme giới hạn *XhoI* và *EcoRV*. 1, 2: các plasmid tái tổ hợp.

Biểu hiện kháng thể đơn chuỗi VHH kháng kháng nguyên Ompa

Trong vector biểu hiện pET-21a(+), hoạt động mã hóa kháng thể VHH được điều khiển bởi operon *lac* với cơ chế kiểm soát chặt chẽ bởi chất cảm ứng IPTG. Để kiểm tra khả năng biểu hiện tạo protein tái tổ hợp của chủng vi khuẩn mang gen *bgc*, một khuẩn lạc *E. coli* BL21 (DE3) mang gen mã hóa kháng thể đơn chuỗi VHH kháng kháng nguyên Ompa được đem nuôi lắc qua đêm trong môi trường LB lỏng có bổ sung ampicillin 100mg/mL ở 37 °C. Sau đó tế bào được làm mới bằng cách chuyển sang bình nuôi cấy khác chứa môi trường LB- có bổ sung ampicillin 100mg/mL sao cho OD600 ban đầu chỉ đạt 0,1 và nuôi lắc ở cùng điều kiện đến khi OD600 đạt từ 0,6 thì bổ sung IPTG đến nồng độ cuối cùng là 0,1 mM và cảm ứng trong 5 h trong

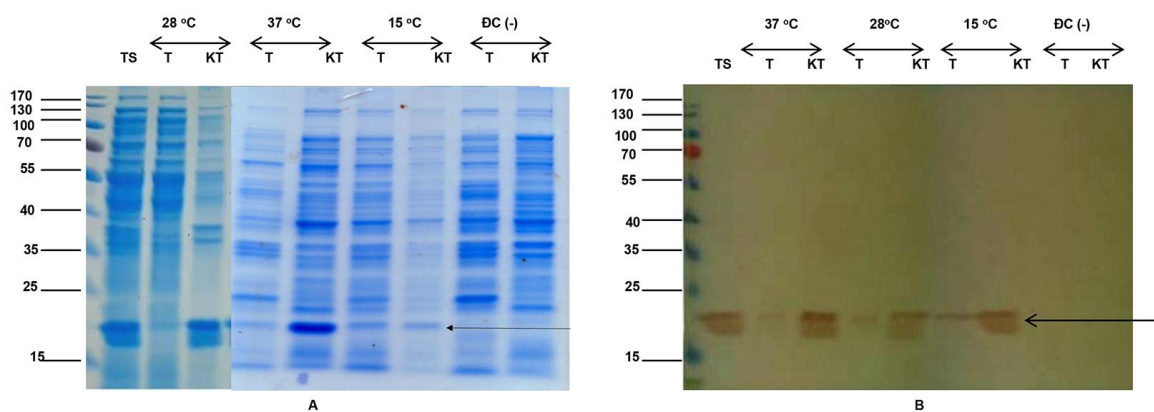
điều kiện nuôi lắc ở 37 °C, 28 °C, 15 °C với tốc độ lắc 200 rpm/min để tổng hợp kháng thể VHH. Dòng đối chứng âm được chọn là vector pET21a(+) không mang gen cũng được nuôi cấy song song cùng điều kiện. Sau 5 h nuôi cấy, chúng tôi tiến hành ly tâm thu sinh khối tế bào sau đó đưa các mẫu về cùng OD600= 10 và thực hiện phá vỡ tế bào bằng siêu âm. Tiếp theo mẫu protein được biến tính bằng đệm biến tính và điện di kiểm tra trên gel SDS-PAGE 12%.

Kết quả ở hình 4 cho thấy sự xuất hiện băng protein có kích thước khoảng 20kDa, cao hơn so với tính toán lý thuyết là 17,54 KDa, điều này được giải thích vì trong phân tử protein VHH có 1 vị trí glycosyl hóa giữa CDR1 và CDR3, do vậy điều này ảnh hưởng đến sự di chuyển của protein trong quá trình phân tách bởi điện di SDS-PAGE. Trong khi đó ở đường chạy đối chứng là chủng

không mang gen lại không xuất hiện băng protein này, điều này chứng tỏ kháng thể VHH đã được biểu hiện trong chủng *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp. Tuy nhiên, khi thử biểu hiện kháng thể VHH ở các nhiệt độ khác nhau như 37°C, 28°C và thậm chí hạ nhiệt độ biểu hiện xuống là 15°C thì kháng thể VHH chủ yếu tập trung ở pha không tan. Sự biểu hiện của kháng thể VHH mạnh nhất là ở 37°C.

Trong nghiên cứu này đoạn gen mã hóa VHH được thiết kế gắn đuôi c-myc để thuận tiện cho phân ứng lại Western blot kiểm tra sự có mặt của kháng thể VHH. Đồng thời đoạn gen mã hóa

VHH còn được gắn thêm 6xHis ở đầu 5' để tiện cho thí nghiệm tinh sạch. Kết quả kiểm tra sự biểu hiện của kháng thể VHH kháng Ompa bằng phản ứng Western blot sử dụng kháng thể kháng c-myc được thể hiện trong hình 4B. Băng vạch thu được trong Western blot có kích thước tương tự như băng vạch được xác định trong Coomassie blue. Từ kết quả trên ta nhận thấy, cả hai kháng thể VHH đã được biểu hiện thành công trong dòng tế bào *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp. Đồng thời chúng tôi nhận thấy, kháng thể VHH chủ yếu biểu hiện ở pha không tan, nên tiến hành tinh sạch kháng thể VHH trong điều kiện biến tính với Urea 8M.



Hình 4. Kết quả kiểm tra sự biểu hiện của kháng thể đơn chuỗi VHH kháng nguyên Ompa ở các nhiệt độ nuôi cấy khác nhau bằng SDS-PAGE (A) và bằng Western blot (B). ở 37°C; B. ở 2 °C; C. ở 15°C. TS: protein tổng số; T: protein pha tan; KT: protein pha không tan. Đối chứng (-): không cảm ứng IPTG.

Tinh sạch các kháng thể đơn chuỗi VHH kháng kháng nguyên Ompa

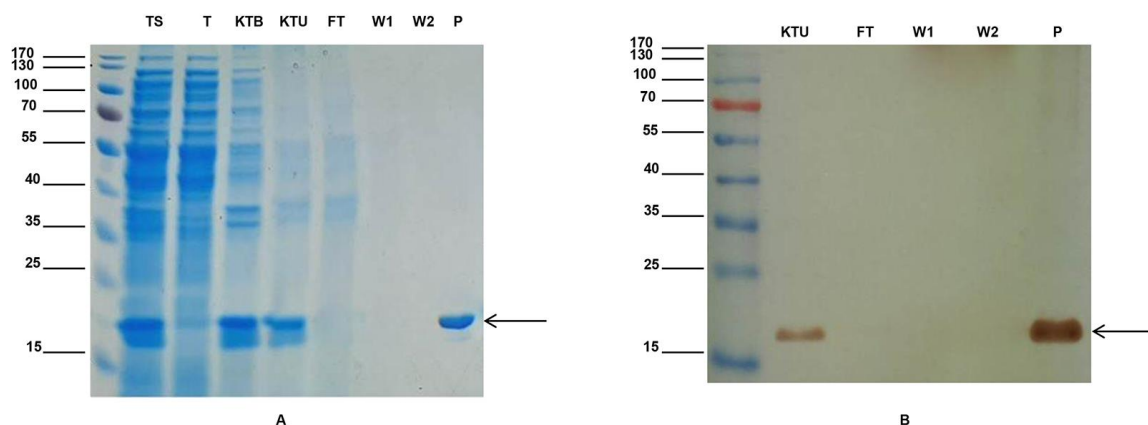
Các kháng thể đơn chuỗi VHH kháng Ompa được tinh sạch bằng sắc ký ái lực dựa vào His-tag trong điều kiện biến tính. Kết quả tinh sạch được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE, nhuộm coomassie blue cho thấy đã tinh sạch thành công các kháng thể VHH kháng Ompa ở điều kiện biến tính (Hình 5A).

Quá trình tinh sạch kháng thể VHH kháng Ompa cũng được xác nhận lại bằng phản ứng lai miễn dịch Western blot sử dụng kháng thể kháng c-myc (Hình 5B). Kết quả lai Western blot cho

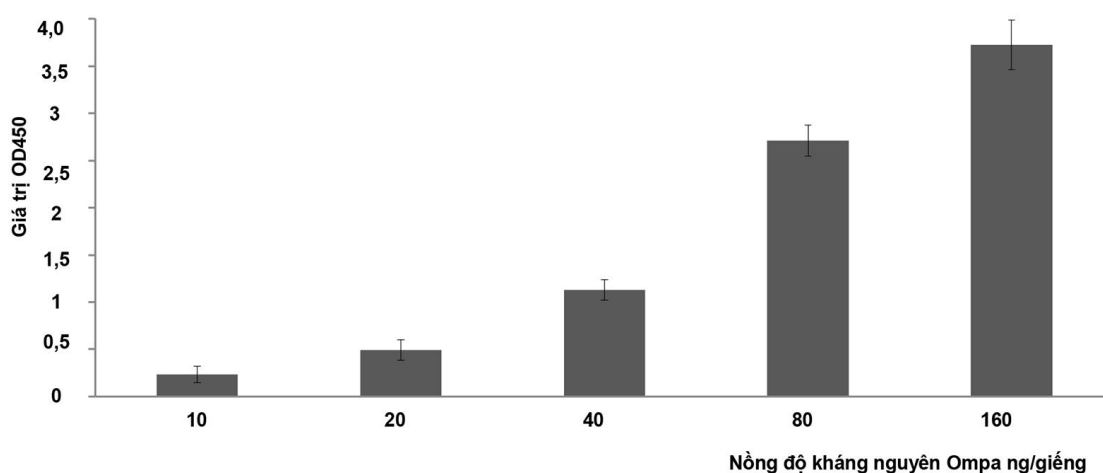
thấy, kháng thể VHH kháng Ompa đã được tinh sạch thành công, protein thu được có độ tinh sạch khá cao, không lẫn các protein nền khác.

Kiểm tra độ nhạy của kháng thể đơn chuỗi VHH kháng Ompa bằng các phản ứng ELISA

Độ nhạy của kháng thể VHH kháng kháng nguyên Ompa của vi khuẩn gây bệnh vàng lá gân xanh được kiểm tra bằng phản ứng ELISA gián tiếp. Kháng nguyên Ompa của vi khuẩn gây bệnh được pha loãng về các nồng độ 10 ng, 20 ng, 40 ng, 60 ng, 80 ng, 160 ng/giếng. Kết quả của phản ứng ELISA gián tiếp được thể hiện ở hình 6.



Hình 5. Kết quả tinh sạch kháng thể đơn chuỗi VHH kháng kháng nguyên Ompa ở điều kiện biến tính. A. Kết quả điện di SDS-PAGE, nhuộm Coomassie blue kiểm tra quá trình tinh sạch các kháng thể VHH kháng kháng nguyên Ompa ở điều kiện biến tính. Các phân đoạn trong quá trình tinh sạch TS: protein tổng số, T: Protein hòa tan, KTB: Protein ở pha cặn trước khi bổ sung 8M Urea, KTU: Protein ở pha cặn sau khi được bổ sung 8M Urea, FT: protein không bám Ni-sepharose (GE), W1, W2: Pha rửa chảy qua cột, P: Protein tinh sạch thu được trong 8M Urea. B. Kết quả lai Western blot kiểm tra protein sau khi tinh sạch bằng kháng thể anti-cmyc. KTU: Protein pha cặn sau khi bổ sung 8M Urea, FT: dịch chảy qua không bám Ni-NTA; W1, W2: Dịch chảy qua cột khi rửa; P: Protein tinh sạch



Hình 6. Kết quả kiểm tra độ nhạy của các kháng thể VHH với các kháng nguyên vi khuẩn gây bệnh HLB bằng phản ứng ELISA gián tiếp. Giá trị thực được tính sau khi trừ giá trị OD450 của sữa 5% trong PBS.

Từ kết quả phản ứng ELISA gián tiếp cho thấy rằng, kháng thể VHH có ái lực tốt với kháng nguyên Ompa, và với hàm lượng Ompa nhỏ nhất là 10 ng/giếng (0,01ng/ μ l) đã cho tín hiệu ELISA dương tính. Tín hiệu ELISA tăng dần khi tăng hàm lượng kháng nguyên Ompa tăng lên. Giá trị OD450 bằng 1,21 khi tăng hàm

lượng kháng nguyên Ompa lên 40 ng, 80 ng và ở hàm lượng 160 ng thì tín hiệu ELISA đạt cao nhất là 3,7. Qua đây có thể một lần nữa khẳng định rằng, kháng thể đơn chuỗi VHH kháng Ompa được tạo ra là có ái lực tốt với kháng nguyên Ompa của vi khuẩn gây bệnh vàng lá gân xanh. Yuan và đồng tác giả (2016) cũng đã

nghiên cứu tạo kháng thể đơn chuỗi scFv kháng các protein bề mặt của CLAs, trong đó kháng thể đơn chuỗi scFv kháng Ompa cho giá trị ELISA cao nhất (Yuan *et al.*, 2016). Trong nghiên cứu của Yuan và đồng tác giả, khi sử dụng dòng kháng thể scFv kháng Ompa thì cho giá trị OD450 bằng 1,01 tại nồng độ kháng nguyên Ompa bằng 50 µg/mL, tương ứng với hàm lượng Ompa tinh sạch sử dụng trong phản ứng ELISA là 5 µg, hàm lượng này là cao gấp 125 lần so với hàm lượng Ompa cần dùng trong nghiên cứu của chúng tôi. Như vậy, dòng kháng thể VHH kháng Ompa của chúng tôi tạo ra là có ái lực với kháng nguyên Ompa tinh sạch tốt hơn so với dòng kháng thể scFv của Yuan và đồng tác giả. Điều này mở ra triển vọng ứng dụng kháng thể đơn chuỗi VHH trong việc phát hiện bệnh vàng lá gân xanh trên cây có múi. Những nghiên cứu tiếp theo sẽ tập trung vào việc đánh giá khả năng sử dụng kháng thể đơn chuỗi VHH trong việc phát hiện bệnh vàng lá gân xanh trên cây có múi bằng các phương pháp như ELISA, dot-blot...

KẾT LUẬN

Như vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thành công trong quá trình sàng lọc, thiết kế vector biểu hiện và đánh giá hoạt tính của kháng thể đơn chuỗi VHH kháng kháng nguyên Ompa của vi khuẩn gây bệnh vàng lá gân xanh. Kháng thể đơn chuỗi VHH tạo ra có ái lực tốt với kháng nguyên Ompa. Điều này mở ra triển vọng ứng dụng kháng thể đơn chuỗi VHH trong việc phát hiện bệnh vàng lá gân xanh trên cây có múi.

Lời cảm ơn: Kết quả nghiên cứu này thuộc đề tài “Nghiên cứu sản xuất KIT chẩn đoán bệnh vàng lá greening và bệnh tàn lụi (CTV) trên cây có múi”, thời gian thực hiện: 2017-2020, thuộc Chương trình Công nghệ sinh học Nông nghiệp – Thủy sản, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Arredondo VR, Delgado OJC, Beltrán BM, Anguiano CJ, Cerna CE, Rodríguez PY, Ochoa FYM (2016) A

review of techniques for detecting Huanglongbing (greening) in citrus. *Can J Microbiol* 62: 803–811.

Bové JM (2006) Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *JPP* 88: 7–37.

Conrad U, Plagmann I, Malchow S, Sack M, Floss DM, Kruglov AA, Nedospasov SA, Rose-John S, Scheller J (2011) ELPylated anti-human TNF therapeutic single-domain antibodies for prevention of lethal septic shock. *Plant Biotechnol J* 9: 22–31.

Cortez-Retamozo V, Backmann N, Senter PD, Wernery U, De BP, Muyltermans S, Revets H (2004) Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Res* 64: 2853–2857.

Da Graca JV (1991) Citrus greening disease. *Annu Rev Phytopathol* 29: 109-136.

Deffar K, Shi H, Li L, Wang X, Zhu X (2009) Nanobodies-the new concept in antibody engineering. *Afr J Biotechnol* 18: 2645–2652.

Ding F, Duan Y, Paul C, Brlansky RH, Hartung JS (2015) Localization and distribution of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in citrus and periwinkle by direct tissue blot immuno assay with an Anti-Ompa polyclonal antibody. *PLOS ONE* 10: e0123939.

Ding F, Duan Y, Yuan Q, Shao J, Hartung JS (2016) Serological detection of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in citrus, and identification by GeLC-MS/MS of a chaperone protein responding to cellular pathogens. *Sci Rep* 6: 29272.

Ding F, Paul C, Brlansky R, Hartung JS (2017) Immune tissue print and immune capture-PCR for diagnosis and detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Sci Rep* 7: 46467.

Garnier M, Gao SJ, He YL, Villechanoux S, Gandar J, Bové JM (1991) Study of the Greening Organism (GO) with Monoclonal Antibodies: Serological Identification, Morphology, Serotypes and Purification of the GO. *IOCV*, Riverside, California.

Gottwald TR (2010) Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. *Annu Rev Phytopathol* 48: 119–139.

Gottwald TR, da Gracia JV, Bassanezi RB (2007) Citrus huanglongbing: the pathogen, its epidemiology, and impact. *Plant Health Progress*.

Joosten V, Roelofs MS, van den Dries N, Goosen T, Verrips CT, van den Hon-del CA, Lokman BC (2005)

- Production of bifunctional proteins by *Aspergillus awamori*: llama variable heavy chain antibody fragment (VHH) R9 coupled to *Arthromyces ramosus* peroxidase (ARP). *J Biotechnol* 120: 347–359.
- Manfred G, Udo C (2009) Immunomodulation of Plant Function by In Vitro Selected Single-Chain Fv Intrabodies. *Methods in Molecular Biology, Recombinant Proteins From Plants*, vol. 483 © Humana Press, a part of Springer Science+ Business Media, LLC 2009.
- Olichon A, Schweizer D, Muyltermans S, de Marco A (2007) Heating as a rapid purification method for recovering correctly-folded thermotolerant VH and VHH domains. *BMC Biotechnol* 7: 83–94.
- Rajabi BM, Rasaee MJ, Foruzandeh M, Rahimpour A, Kiani J, Rahbarizadeh F, Alirezapour B, Mohammad M (2007) Production of chimeric recombinant single domain antibody-greenfluorescent fusion protein in Chinese hamster ovary cells. *Hybridoma* 26: 1–9.
- Shen W, Halbert SE, Dickstein E, Manjunath KL, Shimwela MM, van Bruggen AHC (2013) Occurrence and in-grove distribution of citrus Huanglongbing in North Central Florida. *J Plant Pathol* 95: 361–371.
- Teixeira DC, Saillard C, Couture C, Martins EC, Wulff NA, Eveillard JS, Yamamoto PT, Ayres AJ, Bové JM (2008) Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. *Mol Cell Probes* 22: 139–150.
- Thomassen YE, Verkleij AJ, Boonstra J, Verrips CT (2005) Specific production rate of VHH antibody fragments by *Saccharomyces cerevisiae* correlated with growth rate, independent of nutrient limitation. *J Biotechnol* 118: 270–277.
- Yuan Q, Jordan R, Brlansky RH, Minenkova O, Hartung J (2016) Development of single chain variable fragment (scFv) antibodies against surface proteins of *Ca. Liberibacter asiaticus*. *J Microbiol Methods* 122: 1–7.

PRODUCTION OF VHH ANTIBODY AGAINST OMPA PROTEIN OF *CANDIDATUS LIBERIBACTER ASIATICUS* CAUSING CITRUS GREENING DISEASE

Ho Thi Thuong¹, Nguyen Thi Thom¹, Nguyen Thi Tra¹, Trinh Thai Vy¹, Pham Bich Ngoc¹, Le Van Son¹, Nguyen Thi Bich Ngoc², Chu Hoang Ha¹

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Plant Protection Research Institute. Vietnam Academy of Agricultural Sciences*

SUMMARY

Citrus Greening, also known as HuangLongbing (HLB), is considered one of the most dangerous citrus diseases, and limiting the production of citrus trees all over the world. Production of antibodies against Ompa protein of *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) for detection of citrus greening disease is considered as promising research direction. In this study, for the purpose of producing antibodies against Ompa of CLAs, we firstly used the camel VHH antibody library for screening VHH antibodies against Ompa using phage-display technique. Next, phages which had strong interaction with Ompa as shown in ELISA were selected for phagemid isolation and the DNA fragments encoding VHH antibodies were sequenced. The DNA fragment encoding the best VHH antibody was then selected and inserted into the expression vector pET-21a (+), then cloned in *E. coli* DH5 α strain and expressed in BL21 (DE3) strain. The expression of VHH antibodies against Ompa was optimized at different temperatures with an inductive concentration of 0.1 M IPTG. Anti-Ompa VHH antibodies were purified under denatured conditions then re-folded. The biological activity of the VHH antibody with Ompa antigen was assessed by indirect-ELISA reaction. Results indicated that the VHH

Tạp chí Công nghệ Sinh học 18(3): 529-541, 2020

antibody had a very strong interaction with the Ompa antigen. This opens up the prospect of applying VHH antibody in the detection of citrus greening disease.

Keywords: Citrus greening disease, VHH antibody, Camel library, phage-display technique, *Candidatus Liberibacter asiaticus*.