

TẠO KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU KHÁNG PROTEIN P10 CỦA VIRUS LÙN SỌC ĐEN PHƯƠNG NAM BẰNG PEPTIDE TỔNG HỢP

Đỗ Thị Hạnh¹, Phạm Thu Hằng², Nguyễn Thanh Hà², Nguyễn Thị Thu Hà², Phùng Thị Thu Hương², Phạm Xuân Hội², Nguyễn Duy Phương^{2,✉}

¹Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

²Viện Di truyền nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: phuondn.bio@gmail.com

Ngày nhận bài: 03.4.2020

Ngày nhận đăng: 09.9.2020

TÓM TẮT

Bệnh lúa lùn sọc đen do virus lùn sọc đen phương Nam (*Southern rice black-striking dwarf virus - SRBSDV*) đã gây ra những thiệt hại nghiêm trọng cho các vùng trồng lúa miền Bắc và miền Trung Việt Nam. Trong khi các phương pháp chẩn đoán SRBSDV chính xác dựa trên RT-PCR khó có thể áp dụng đại trà ở các cơ sở địa phương do sự phức tạp về mặt kỹ thuật. Các phương pháp chẩn đoán SRBSDV dựa trên kỹ thuật kháng nguyên-kháng thể đơn giản và dễ dàng triển khai rộng rãi vẫn chưa được phát triển ở Việt Nam. Khó khăn lớn nhất hiện nay là vẫn chưa có kháng thể đặc hiệu kháng SRBSDV ở dạng thương mại. Trước đây, để phát triển kỹ thuật chẩn đoán SRBSDV bằng kỹ thuật ELISA, kháng thể kháng đặc hiệu SRBSDV đã được tạo ra bằng protein vỏ P10 tái tổ hợp (khối lượng 66 kDa) với hiệu giá 1:5000. Trong nghiên cứu này, kháng thể đa dòng kháng đặc hiệu SRBSDV được tạo ra từ kháng nguyên là đoạn peptide (PASTTDVTHYGGY) giàu tính kháng nguyên có nguồn gốc từ protein vỏ P10 của SRBSDV và bảo thủ ở các nòi SRBSDV của Việt Nam. Kháng thể tinh sạch thu được liên kết đặc hiệu với protein P10 ở nồng độ kháng thể pha loãng 1:40000 và phát hiện được sự có mặt của SRBSDV trong mẫu lúa nhiễm bệnh lùn sọc đen bằng kỹ thuật Dot-ELISA (Dot enzyme-linked immunosorbent assay). Kết quả nghiên cứu này mở ra một cơ hội mới để phát triển bộ kit chẩn đoán nhanh SRBSDV dạng màng ở Việt Nam.

Từ khóa: Dot-ELISA, kháng thể đa dòng, lúa, protein P10, SRBSDV.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh lúa lùn sọc đen do SRBSDV gây ra được phát hiện lần đầu tiên ở Việt Nam vào năm 2009 đã gây ra thiệt hại nghiêm trọng trên hàng nghìn ha trồng lúa ở miền Bắc và miền Trung. SRBSDV là một thành viên mới thuộc phân nhóm Fijivirus của họ *Reoviridae* (Guo *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Ha *et al.*, 2009; Ngô Vĩnh Viễn *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Matshukura *et al.*, 2013). Hệ gen của SRBSDV gồm 10 phân đoạn RNA sợi đôi, trong đó phân đoạn S10 mã hóa cho protein vỏ ngoài của virus (62,6 kDa), có tính bảo thủ cao. Do đó, các nghiên cứu phát triển phương pháp chẩn đoán SRBSDV thường lựa chọn protein P10 là đối tượng nghiên cứu (Yin *et al.*, 2011).

Cho tới nay, biện pháp quản lý bệnh lúa lùn sọc đen vẫn chủ yếu nhằm vào kiểm soát nguồn bệnh, phát hiện sớm sự xuất hiện của virus và xử lý vector truyền bệnh (rầy lưng trắng). Phương pháp chẩn đoán

SRBSDV phổ biến nhất được sử dụng hiện nay là phát hiện RNA hệ gen của SRBSDV dựa trên kỹ thuật RT-PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho phân đoạn S10 (Zhang *et al.*, 2008). Một số phòng thí nghiệm ở Trung Quốc đã sản xuất kháng thể kháng SRBSDV bằng các đoạn peptide được tổng hợp nhân tạo có chiều dài khoảng 20 amino acid và phát triển kỹ thuật chẩn đoán bằng Dot-ELISA (Wang *et al.*, 2012).

Ở Việt Nam, mặc dù phương pháp chẩn đoán SRBSDV bằng RT-PCR đã được phát triển từ những năm trước, nhưng do những khó khăn nhất định về chi phí và kỹ thuật, việc chẩn đoán SRBSDV vẫn chủ yếu dựa vào quan sát triệu chứng bệnh điển hình (Ha *et al.*, 2009; Ngô Vĩnh Viễn *et al.*, 2009; Hoang *et al.*, 2011). Trong các nghiên cứu trước, chúng tôi đã tạo thành công kháng thể đa dòng kháng SRBSDV từ đoạn protein vỏ P10 tái tổ hợp có khối lượng 66 kDa; kháng thể tinh sạch đạt hiệu giá 1:5000 và có thể phát hiện được SRBSDV trong mẫu lúa bệnh bằng kỹ thuật

ELISA. Để hướng tới mục tiêu phát triển bộ kit chẩn đoán nhanh SRBSDV dựa trên kỹ thuật kháng nguyên-kháng thể có độ chính xác cao, dễ sử dụng, chi phí rẻ, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu tạo kháng thể đa dòng kháng SRBSDV bằng đoạn peptide tổng hợp có nguồn gốc từ protein vỏ P10 của SRBSDV Việt Nam. Kháng thể tạo ra sẽ là tiền đề cho việc phát triển sản xuất kháng thể kháng đặc hiệu SRBSDV, tiến tới chủ động nguồn kháng thể để phát triển bộ kit chẩn đoán nhanh SRBSDV dạng màng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Các mẫu bệnh lúa khô/nhiễm SRBSDV bằng lây nhiễm nhân tạo do Trung tâm Bệnh cây nhiệt đới, Học viện Nông nghiệp Việt Nam cung cấp. Cụ thể, các cây lúa khô 20 ngày tuổi được lây nhiễm với rầy lưng trắng (tuổi 3-4) mang SRBSDV, mật độ 5-10 rầy/cây. Các cây lúa lây nhiễm sau 20 ngày có triệu chứng bệnh điển hình được kiểm tra xác định sự có mặt của SRBSDV bằng RT-PCR.

Chuột bạch thí nghiệm (6-8 tuần tuổi) đặt mua từ Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

Dịch chiết vi khuẩn *E. coli* mang lần lượt vector pET28a/P10 và vector pET28a, mẫu protein P10 tái tổ hợp tinh sạch được cung cấp bởi Bộ môn Bệnh học phân tử - Viện Di truyền nông nghiệp (Phạm Thanh Tâm *et al.*, 2013).

Peptide tái tổ hợp dung hợp được đặt mua từ Công ty GL Biochem (Thượng Hải, Trung Quốc) (Wang *et al.*, 2012).

Phương pháp

Thiết kế đoạn peptide bảo thủ giàu tính kháng nguyên

Trình tự amino acid bảo thủ trên protein P10 của SRBSDV được phân tích bằng phần mềm BioEdit 2.0 dựa trên trình tự phân đoạn S10 của các chủng SRBSDV Việt Nam đã được công bố (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Phần mềm Immune Epitope Database Analysis Resource được sử dụng để dự đoán vùng giàu tính kháng nguyên trên protein P10. Đặc điểm tính ưa nước và khả năng nằm trên bề mặt phân tử của amino acid trên phân tử protein P10 được phân tích bằng công cụ Antibody Epitope prediction (<http://tools.immuneepitope.org/>); vị trí các vùng epitope trên phân tử protein P10 được dự đoán bằng công cụ Antibody Epitope prediction

(<http://tools.immuneepitope.org/>) và BepiPred-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/>).

Đoạn peptide giàu tính kháng nguyên dung hợp với KLH (Keyhole limpet hemocyanin) (390 kDa) sinh tổng hợp nhân tạo.

Tạo kháng thể đa dòng trên chuột bạch

Quy trình gây miễn dịch trên chuột được thực hiện theo phương pháp đã công bố trước đây (Amero *et al.*, 1994). Protein tinh sạch (20 µg) được trộn đều với 200 µL tá dược và 200 µL đệm PBS. Hỗn hợp được tiêm vào chuột ở vị trí phúc mạc bụng. Sau 10 ngày, chuột được tiêm nhắc lại một lần. Sau mỗi lần tiêm nhắc lại 7 ngày, huyết thanh chuột được thu trước mỗi lần tiêm nhắc lại để kiểm tra đáp ứng miễn dịch bằng kỹ thuật Dot-ELISA (Sambrook *et al.*, 2001). Khi chuột đạt đáp ứng miễn dịch cao nhất, toàn bộ máu chuột được thu để ly chiết huyết thanh.

Tinh sạch kháng thể IgG

Kháng thể IgG trong huyết thanh chuột được tinh sạch bằng cột sắc kí protein A- sepharose (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ) theo phương pháp của Amero *et al.*, (1994). Các phân đoạn ly giải được phân tích trên gel SDS-PAGE và lai thăm tích miễn dịch.

Lai thăm tích miễn dịch (Western blotting)

Protein tái tổ hợp trong mẫu dịch chiết và mẫu tinh sạch được phát hiện bằng kỹ thuật lai thăm tích miễn dịch (Sambrook *et al.*, 2001). Mẫu protein sau khi đã phân tách bằng phương pháp điện di trên gel SDS-PAGE được chuyển lên màng nitrocellulose bằng phương pháp điện chuyển. Màng được cố định bằng cách lắc nhẹ (30 min - 60 min) trong dung dịch BSA 1% và được ủ lần lượt với kháng thể sơ cấp và kháng thể thứ cấp trong thời gian 60 min, ở 37°C. Các băng protein được hiện màu bằng cách ủ màng trong dung dịch cơ chất p-nitro blue tetrazolium chlorid 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP).

Phương pháp Dot-ELISA

Màng PVDF được hoạt hóa bằng cách ngâm trong methanol trong 10 s. Các dung dịch chứa protein đích (được chuẩn bị trong đệm PBS 1 X) được nhỏ trực tiếp lên màng. Các bước khóa màng, ủ kháng thể và hiện màu được thực hiện tương tự kỹ thuật lai thăm tích miễn dịch (Sambrook *et al.*, 2001).

Xác định hiệu giá và tính đặc hiệu của kháng thể

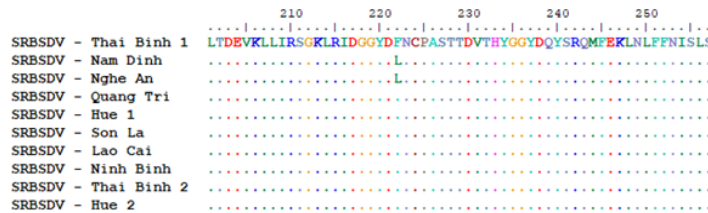
Hiệu giá của kháng thể được xác định bằng kỹ thuật Dot-ELISA. Mẫu kháng thể được pha loãng thành một dải nồng độ từ 1 : 10000 đến 1 : 80000 và kiểm tra khả năng phát hiện protein đích trong mẫu dịch chiết cây lúa nhiễm SRBSDV và mẫu protein P10 tái tổ hợp tinh sạch (50 ng/dot).

Tính đặc hiệu của kháng thể được xác định bằng phương pháp lai thâm tích miễn dịch. Kháng thể được pha loãng tỉ lệ 1 : 10000 và sử dụng để phát hiện protein đích trong mẫu dịch chiết thô tế bào vi khuẩn *E. coli* Rossetta tái tổ hợp mang vector pET28a/P10. Mẫu protein P10 tái tổ hợp tinh sạch (50 ng/giếng) được sử dụng làm đối chứng dương. Mẫu dịch chiết thô tế bào vi khuẩn *E. coli* Rossetta tái tổ hợp mang vector pET28a được sử dụng làm đối chứng âm.

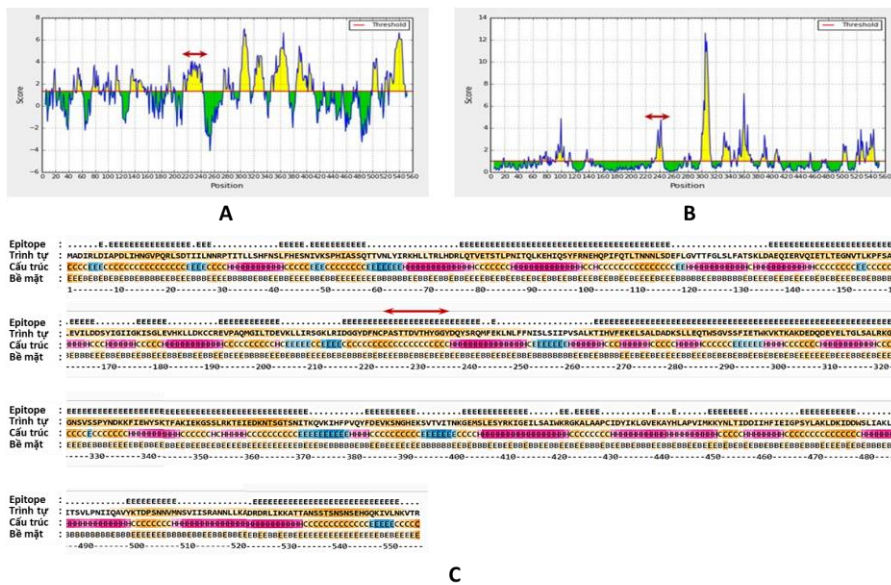
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xác định vùng peptide bảo thủ giàu tính kháng nguyên trên protein P10 của SRBSDV

Epitope là những vùng polypeptide nằm trên bề mặt cấu trúc protein, được nhận biết bởi hệ miễn dịch của động vật, quyết định tính kháng nguyên của protein. Để tạo kháng thể có khả năng nhận biết đặc hiệu protein P10 của các isolate SRBSDV Việt Nam, đoạn peptide được lựa chọn làm kháng nguyên gây đáp ứng miễn dịch theo tiêu chí (i) nằm trên vùng bảo thủ và (ii) nằm trong vùng giàu tính kháng nguyên (có tính ưa nước, nằm trên bề mặt phân tử, có khả năng tạo epitope) của protein P10. Dựa trên các trình tự đã công bố (Nguyễn Hoàng Quang *et al.*, 2013), vùng bảo thủ trên protein P10 của các isolate SRBSDV Việt Nam đã được xác định (Hình 1).



Hình 1. Một phần trình tự amino acid suy diễn trên protein P10. Ghi chú: Trình tự amino acid suy diễn của 10 isolate SRBSDV Việt Nam (Thai Binh 1 - KM454854, Nam Dinh - KM454847, Nghe An - KM454845, Quang Tri - KM454850, Hue 1 - KM454843, Son La - KM454852, Lao Cai - KM454846, Ninh Binh - KM454848, Thai Binh 2 - KM454855, Hue 2 - KM454844) được phân tích bằng phần mềm BioEdit 2.0. Dấu chấm thể hiện các amino acid giống nhau.

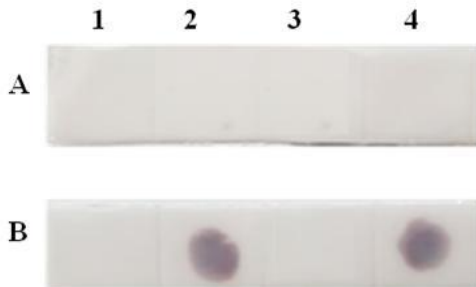


Hình 2. Dự đoán vùng peptide có tính kháng nguyên và bảo thủ trên protein P10. Ghi chú: Tính ưa nước (A), khả năng nằm trên bề mặt phân tử (B) của các amino acid trên protein P10 được phân tích bằng công cụ Antibody Epitope prediction; đường màu đỏ thể hiện giá trị ngưỡng. Vị trí epitope và cấu trúc phân tử protein P10 được phân tích bằng công cụ BepiPred-2.0 (C); "Epitope" – dự đoán vị trí epitope trên chuỗi polypeptide, dấu chấm thể hiện vị trí không tạo epitope, chữ E thể hiện vị trí có khả năng tạo epitope; "Trình tự" – trình tự amino acid suy diễn; "Cấu trúc" – dự đoán cấu trúc chuỗi polypeptide, chữ H thể hiện vị trí có cấu trúc xoắn α , chữ E thể hiện vị trí có cấu trúc gấp nếp β , chữ C thể hiện vị trí có cấu trúc xoắn kép; "Bề mặt" – dự đoán vị trí amino acid nằm trên bề mặt phân tử protein, chữ B thể hiện vị trí amino acid nằm phía trong cấu trúc phân tử protein, chữ E thể hiện vị trí amino acid nằm trên bề mặt phân tử. Mũi tên (<->) chỉ vị trí peptide P10.225-237 trên chuỗi polypeptide.

Các vị trí peptide giàu tính kháng nguyên trên protein vỏ P10 được lựa chọn bằng các công cụ tin sinh (Hình 2). Kết quả phân tích đã xác định được đoạn peptide PASTTDVTHYGGY (đặt tên là P10.225-237) trên protein P10 đáp ứng đồng thời các điều kiện (i) tập trung các amino acid ưa nước (Hình 2A) và (ii) có khả năng nằm trên bề mặt phân tử (Hình 2B), (iii) có khả năng tạo epitope (Hình 2C) và (iv) nằm trên vùng bảo thủ của protein P10 (Hình 1). Trình tự peptide này đã được lựa chọn để tổng hợp kháng nguyên gây đáp ứng miễn dịch trên chuột.

Gây đáp ứng miễn dịch trên chuột bạch

Để tăng tính kháng nguyên, đoạn peptide P10.225-237 đã được dung hợp với protein mang KLH kết hợp với việc bổ sung tá được khi gây miễn dịch trên chuột. Sau 4 lần tiêm, máu chuột được thu lại, ly tâm tách chiết huyết thanh và tiến hành kiểm tra khả năng nhận biết đặc hiệu kháng nguyên bằng kháng thể có trong kháng huyết thanh bằng kỹ thuật lai Dot-ELISA.



Hình 3. Kiểm tra đáp ứng miễn dịch của kháng huyết thanh bằng Dot-ELISA. Ghi chú: (A) Mẫu kiểm tra huyết thanh chuột trước khi tiêm (1:1.000). (B) Mẫu kiểm tra kháng huyết thanh chuột sau 4 lần tiêm (1:1000). Cột 1: đối chứng âm-PBS (không có protein); cột 2: dịch chiết mẫu lúa bệnh; cột 3: Dịch chiết mẫu lúa khỏe; cột 4: mẫu protein P10 tinh sạch (50 ng).

Kết quả phân tích cho thấy kháng huyết thanh chuột trước khi gây miễn dịch không có khả năng nhận diện protein P10 tinh sạch (Hình 3A, cột 4), cũng như không phản ứng với dịch chiết mẫu lúa không nhiễm SRBSDV (Hình 3A, cột 3). Ngược lại, kháng huyết thanh chuột sau 4 lần tiêm (pha loãng 1: 1000) có khả năng nhận biết protein P10 trong mẫu protein tinh sạch (Hình 3B, cột 4) và cho kết quả dương tính với dịch chiết của mẫu lúa nhiễm SRBSDV (Hình 3B, cột 2). Trong khi đó, kháng huyết thanh không có phản ứng chéo với dịch chiết mẫu lúa không nhiễm SRBSDV (Hình 3B, cột 3). Kết quả thu được bước đầu cho phép kết luận rằng việc gây kháng thể đa dòng kháng protein P10 bằng đoạn peptide giàu tính kháng nguyên P10.225-237 trên chuột bạch đã thành công,

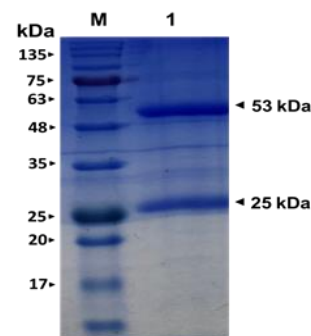
kháng huyết thanh thu được sau khi gây miễn dịch có chứa kháng thể kháng protein P10.

KLH là một glycoprotein khối lượng phân tử lớn, có thể đồng thời kích thích đáp ứng miễn dịch thể dịch và đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào ở người và động vật (Wimmers *et al.*, 2017). Với ưu điểm sinh đáp ứng miễn dịch mạnh, độc tính thấp và dễ sản xuất, KLH được sử dụng rất phổ biến với vai trò là một “protein mang” (carrier protein) trong các nghiên cứu tạo kháng thể kháng các phân tử nhỏ như peptide hay oligosaccharide (Harris *et al.*, 1999; Zarei, *et al.*, 2015; Wimmers *et al.*, 2017). Trong nghiên cứu này, đoạn peptide PASTTDVTHYGGY sau khi dung hợp với KLH cũng đã chứng minh hiệu quả gây đáp ứng miễn dịch đặc hiệu trên chuột sau 4 lần tiêm. Kháng huyết thanh được tạo ra có thể nhận biết sự có mặt của virus gây bệnh trong mẫu lúa nhiễm SRBSDV. Kết quả nghiên cứu này củng cố thêm cho nghiên cứu trước đây về tiềm năng ứng dụng của KLH cũng như khả năng tạo đáp ứng miễn dịch đặc hiệu từ các peptide có khối lượng phân tử nhỏ.

Tinh sạch kháng thể IgG

Kháng thể IgG nhận biết protein P10 được tinh sạch nhằm loại bỏ các thành phần protein không mong muốn có trong kháng huyết thanh. Để khẳng định độ tinh sạch của kháng thể thu được, phân đoạn protein gắn đặc hiệu thu được từ cột protein A- sepharose (phân đoạn 7) được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE. Kết quả phân tích thu được 2 băng protein có kích thước khoảng 25 và 53 kDa (Hình 4B, giếng 1), tương ứng với kích thước của chuỗi nặng (53 kDa) và chuỗi nhẹ (25 kDa) của kháng thể IgG. Kết quả này chứng tỏ kháng thể IgG đã được tinh sạch thành công từ huyết thanh chuột.

Xác định hiệu giá và tính đặc hiệu của kháng thể

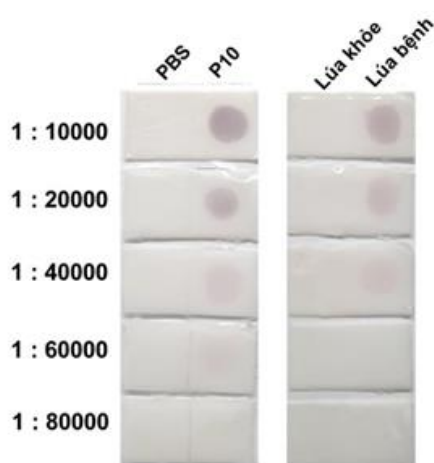


Hình 4. Tinh sạch kháng thể IgG. Ghi chú: Điện di SDS-PAGE kháng thể IgG tinh sạch; giếng M: thang chuẩn protein (iNtRON, Hàn Quốc); giếng 1: phân đoạn E7 tinh sạch kháng thể IgG.

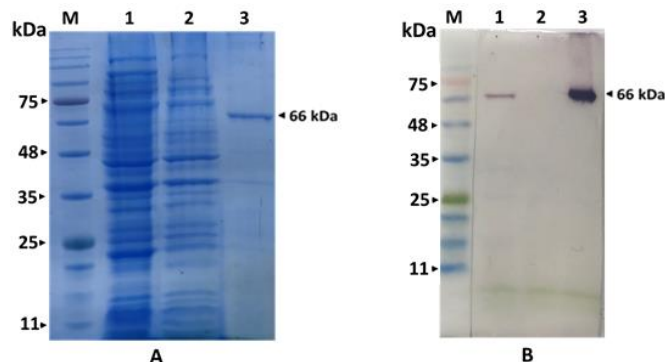
Hiệu giá kháng thể là một yếu tố rất quan trọng để đánh giá hoạt tính của một kháng thể. Để đảm bảo độ nhạy của xét nghiệm chẩn đoán sau này, kháng thể sử dụng cần có hiệu giá cao. Kết quả phân tích Dot-ELISA cho thấy kháng thể IgG tinh sạch có khả năng nhận biết protein đích trên màng lai ở nồng độ pha loãng 1:40000 đối với xét nghiệm mẫu dịch chiết cây lúa bệnh (Hình 5, cột “Lúa bệnh”) và 1: 60000 đối với xét nghiệm mẫu protein P10 tinh sạch (Hình 5, cột “P10”).

Để chứng minh tính đặc hiệu của kháng thể tinh sạch thu được, mẫu dịch chiết thô tế bào vi khuẩn *E. coli* Rossetta tái tổ hợp mang vector pET28a/P10

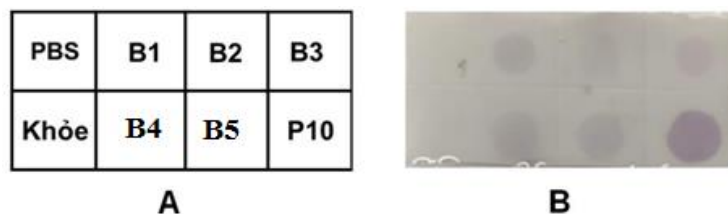
(Phạm Thanh Tâm *et al.*, 2013) đã được sử dụng cho thí nghiệm lai thẩm tích miễn dịch. Kết quả phân tích màng lai cho thấy ở giếng tra mẫu dịch chiết thô tế bào vi khuẩn biểu hiện P10 (Hình 6, giếng 1) chỉ xuất hiện 1 băng duy nhất khoảng 66 kDa tương tự thí nghiệm sử dụng mẫu protein P10 tinh sạch (Hình 6, giếng 3). Ngược lại, với mẫu đối chứng âm sử dụng dịch chiết thô tế bào vi khuẩn *E. coli* Rossetta mang vector pET28a, kết quả lai thẩm tích miễn dịch không thu được băng protein nào (Hình 6, giếng 2). Kết quả này chứng tỏ kháng thể với nồng độ pha loãng 10000 có thể nhận biết đặc hiệu protein P10.



Hình 5. Xác định hiệu giá kháng thể IgG tinh sạch bằng Dot-ELISA. Ghi chú: Mẫu protein P10 tinh sạch (P10) (50 ng), dịch chiết mẫu lúa khỏe (Lúa khỏe), dịch chiết mẫu lúa nhiễm SRBSDV (Lúa bệnh) được cố định trên màng PVDF và ủ với kháng thể IgG tinh sạch pha loãng ở tỉ lệ 1:10000, 1:20000, 1:40000, 1:60000, 1:80000. (PBS) đối chứng âm (không có protein).



Hình 6. Đánh giá tính đặc hiệu của kháng thể IgG tinh sạch. Ghi chú: (A) Mẫu protein được điện di trên gel polyacrylamide 12% (SDS-PAGE). (B) Protein P10 tái tổ hợp được phát hiện bằng kháng thể IgG tinh sạch pha loãng 1:10.000 bằng kỹ thuật lai thẩm tích miễn dịch. Giếng M: thang chuẩn protein (iNtRON); giếng 1: dịch chiết *E. coli* Rossetta mang pET28a/P10; giếng 2: đối chứng âm (dịch chiết *E. coli* Rossetta mang pET28a); giếng 3: protein P10 tinh sạch (50 ng).



Hình 7. Xét nghiệm mẫu lúa nhiễm SRBSDV bằng Dot-ELISA. Ghi chú: (A) Sơ đồ vị trí mẫu trên màng PVDF. (B) Màng PVDF sau khi hiện màu. Mẫu xét nghiệm được cố định trên màng PVDF và ủ với kháng thể IgG tinh sạch (pha loãng tỉ lệ 1:10000, (PBS) đối chứng âm (không có protein); (B1-B5) dịch chiết mẫu lúa nhiễm SRBSDV được lấy nhiễm nhân tạo; (Khỏe) dịch chiết mẫu lúa sạch bệnh; (P10) đối chứng dương (protein P10).

Kháng thể tinh sạch tiếp tục được phân tích bằng kỹ thuật Dot-ELISA để chứng minh hiệu quả xét nghiệm SRBSDV trong các mẫu lúa bệnh nhiễm và không nhiễm virus. Kết quả xét nghiệm cho thấy ở nồng độ pha loãng 1:10000, kháng thể tinh sạch cho kết

quả âm tính với mẫu đối chứng âm (Hình 7, ô “PBS”) và mẫu cây khỏe (Hình 7, ô “Khỏe”), cho kết quả dương tính với tất cả mẫu dịch chiết cây lúa được lấy nhiễm SRBSDV nhân tạo (Hình 7, ô 2-4, ô 6-7). Kết quả này chứng tỏ kháng thể đa dòng tạo được bằng

đoạn peptide bảo thủ giàu tính kháng nguyên P10.225-237 có thể sử dụng để chẩn đoán SRBSDV.

Phương pháp tạo kháng thể đa dòng đặc hiệu bằng đoạn peptide giàu tính kháng nguyên đã được một số nhóm nghiên cứu sử dụng để phát hiện virus gây bệnh trên cây trồng bằng kỹ thuật lai miễn dịch (Gallo *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2019). Ở lúa, Wang *et al.*, (2012) đã công bố tạo thành công kháng thể đa dòng đặc hiệu cho SRBSDV từ 3 đoạn peptide có chiều dài 20 amino acid tương ứng nằm ở vị trí 20-39, 140-159, 319-339 trên trình tự của protein P10. Kháng thể/kháng huyết thanh thu được từ các nghiên cứu này đều có đạt hiệu giá lớn hơn 1:500000 trong các phân tích bằng kỹ thuật ELISA (Wang *et al.*, 2012; Gallo *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2019). Gần đây, chúng tôi cũng đã tạo được kháng thể đặc hiệu cho SRBSDV có hiệu giá 1:5000 khi sử dụng protein P10 tái tổ hợp (dài 557 amino acid) để gây đáp ứng miễn dịch. Do tính đặc hiệu của kháng thể chỉ được quyết định bởi một số vùng giàu tính kháng nguyên trên protein P10, để tăng tính đặc hiệu và hiệu giá của kháng thể, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu tìm những vùng có tính kháng nguyên cao trên protein vỏ P10. Sử dụng phần mềm Immune Epitope Database Analysis Resource, kết hợp với kết quả phân tích tính bảo thủ trên protein P10, đoạn peptide có chiều dài 13 amino acid nằm ở vị trí 225-237 trên trình tự của protein P10 đã được thiết kế và tổng hợp nhân tạo để gây kháng thể. Kháng thể đa dòng thu được có hiệu giá 1:40000 và có thể phân biệt được các mẫu bệnh nhiễm SRBSDV và không nhiễm SRBSDV trong xét nghiệm bằng phương pháp Dot-ELISA. Kết quả này chứng tỏ kháng thể thu được từ P10.225-237 có tính đặc hiệu và hiệu giá cao hơn so với kháng thể thu được từ toàn bộ protein P10. Khi so sánh với kháng thể của Wang *et al.*, (2012), kháng thể đa dòng được tạo ra trong nghiên cứu này có hiệu giá thấp hơn. Tuy nhiên, sự khác biệt này cũng có thể do nhóm nghiên cứu của Wang *et al.*, (2012) đã sử dụng kỹ thuật ELISA để xác định hiệu giá kháng thể. Sự có mặt của dịch lọc trong mẫu lúa sót lại đôi khi có thể ảnh hưởng đến kết quả ELISA. Thực tế, trong xét nghiệm chẩn đoán virus bằng Dot-ELISA, Wang *et al.*, (2012) hay Ahmed *et al.* (2019) cũng chỉ sử dụng kháng thể ở độ pha loãng lần lượt là 1:1500 và 1:250. Kết quả đạt được trong nghiên cứu này có ý nghĩa rất lớn trong việc chủ động tạo kháng thể, phục vụ phát triển kỹ thuật chẩn đoán nhanh SRBSDV bằng kit dạng màng ở Việt Nam.

KẾT LUẬN

Đã xác định được đoạn peptide P10.225-237 có

chiều dài 13 amino acid có tính kháng nguyên cao trên protein vỏ P10 của SRBSDV. Kháng thể IgG đa dòng kháng P10.225-237 đã được tạo ra thành công trên chuột bạch và được tinh sạch bằng hệ thống sắc ký ái lực Protein A–sepharose. Kháng thể tinh sạch có hiệu giá 1:40000, có thể nhận biết đặc hiệu protein P10 tái tổ hợp trong mẫu dịch chiết tế bào vi khuẩn và phân biệt được mẫu lúa nhiễm và không nhiễm SRBSDV bằng kỹ thuật Dot-ELISA ở tỷ lệ pha loãng 1:10000.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí từ dự án “Hoàn thiện công nghệ sản xuất KIT chẩn đoán virus gây bệnh lùn sọc đen phương Nam” (2019-2020) do Viện Di truyền nông nghiệp là chủ trì, thuộc Chương trình Công nghệ sinh học Nông nghiệp - Thủy sản, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmed MS, Khalid AA, Adel AR, Hossam SEB, Sherif MEG (2019) Production of polyclonal antibodies to some potato viruses using synthetic peptides. *Fresenius Environ Bull* 28: 4870-4877.
- Amero SA, James TC, Elgin CR (1994) *Production of antibodies using protein in gel bands*. In: Basic protein and peptide protocols (32). Humana Press, Springer: 717-720.
- Guo HZ, Jung WJ, Jiang CD, Peng L, Lin D, Guang ZS (2008) Southern rice black-streaked dwarf virus: A new proposed Fijivirus species in the family Reoviridae. *Chin Sci Bull* 53: 3677-3685.
- Ha VC, Nguyen V, Vu TM, Masaru M (2009) Rice dwarf disease in North Vietnam in 2009 is caused by southern rice black-streaked dwarf virus (SRBSDV). *Bull Inst Trop Agric Kyushu Univ*: 85-92.
- Harris JR, Markl J (1999) Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron* 30: 597-623.
- Hoang AT, Zhang HM, Yang J, Chen JP, Hebrard E, Zhou GH, Vinh VN, Cheng JA (2011) Identification, characterization, and distribution of southern rice black-streaked dwarf virus in Vietnam. *Plant Dis* 95: 1063-1069.
- Matshukura K, Towata T, Sakai J, Onuki M, Matsumura M (2013) Dynamics of southern rice black-streaked dwarf virus in rice and implication for virus acquisition. *Phytopath* 103: 509-512.
- Ngô Vĩnh Viễn, Phạm Thị Vương, Nguyễn Như Cường, Tạ Hoàng Anh, Nguyễn Thị Me, Phan Bích Thu, Phạm Hồng Hiền, Hà Viết Cường (2009) Kết quả chẩn đoán bệnh virus lúa lùn sọc đen ở một số tỉnh miền Bắc Việt Nam. *Tạp chí Bảo vệ thực vật* 6: 8-18.
- Nguyễn Hoàng Quang, Đỗ Thị Hạnh, Phạm Thị Vân, Trần Thị Như Hoa, Hà Viết Cường, Phạm Xuân Hội (2013) Phân tích

trình tự phân đoạn S10 của các chủng virus gây bệnh lúa lùn sọc đen ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và công nghệ Nông nghiệp Việt Nam* 2: 26-31.

Phạm Thanh Tâm, Phạm Thị Vân, Nguyễn Hoàng Quang, Nguyễn Duy Phương, Phạm Xuân Hội (2013) Biểu hiện và tinh sạch protein vỏ P10 của virus SRBSDV gây bệnh lúa lùn sọc đen trong tế bào vi khuẩn *E. coli*. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn* 231(2): 35-40.

Gallo Y, Gutiérrez PA, Marín M (2013) Detection of PMTV using polyclonal antibodies raised against a capsid-specific peptide antigen. *Rev Fac Nat Agr Medellín* 66(2): 6999-7008.

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Wang Q, Yang J, Zhou GH, Zhang HM, Chen JP, Adams MJ (2010) The complete genome sequence of two isolates of southern rice black-streaked dwarf virus, a new member of the genus Fijivirus. *J. Phytopathol* 158: 733-737.

Wang Z, Yu D, Li X, Zeng M, Chen Z, Bi L, Liu J, Jin L, Hu D, Yang S, Song B (2012) The development and application of a Dot-ELISA assay for diagnosis of southern rice black-streaked dwarf virus in the field. *Viruses* 4: 167-183.

Wimmers F, de Haas N, Scholzen A, Schreibelt G, Simonetti E, Eleveld MJ, Brouwers HMLM, Beldhuis-Valkis M, Joosten I, de Jonge MI, Gerritsen WR, de Vries IJM, Diavatopoulos DA, Jacobsb JFM (2017). Monitoring of dynamic changes in Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)-specific B cells in KLH-vaccinated cancer patients. *Sci Rep* 7: 43486.

Zarei S, Bayat AA, Hadavi R, Mahmoudi AR, Tavangar B, Vojgani Y, Jeddi-Tehrani M, Amirghofran Z (2015) Production and characterization of a peptide-based monoclonal antibody against CD44 variant 6. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 34:36-43.

Zhang HM, Yang J, Chen JP, Adams MJ (2008) A black-streaked dwarf disease on rice in China is caused by a novel fijivirus. *Arch Virol* 153: 1893-1898.

Zhang S, Zhang D, Liu Y, Luo X, Cheng J, Peng J (2013) Development of a real-time RT-PCR method for detection and qualification of southern rice black-streaked dwarf virus in rice. *J Plant Pathol Microbiol* 4: 7.

Yin X, Xu F, Zheng F, Li X, Liu B, Zhang C (2011) Molecular characterization of segments S7 to S10 of a southern rice black-streaked dwarf virus isolate from maize in Northern china. *Virologica Sinica* 26: 47-53.

PRODUCTION OF PEPTIDE-SPECIFIC ANTIBODY AGAINST PROTEIN P10 OF SOUTHERN RICE BLACK-STRIKED DWARF VIRUS

Do Thi Hanh¹, Pham Thu Hang², Nguyen Thanh Ha², Nguyen Thi Thu Ha², Phung Thi Thu Huong², Pham Xuan Hoi², Nguyen Duy Phuong²

¹*Hanoi University of Industry*

²*Agricultural Genetics Institute, Vietnam Academy of Agricultural Sciences*

SUMMARY

Virus Southern rice black-striking dwarf virus (SRBSDV) disease caused serious damage rice growing areas in Northern and Central Vietnam over the past decade. While the application of SRBSDV diagnostic methods based on the Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique was impossible due to technical complexity, simpler SRBSDV diagnostic techniques using specific antibody have not yet been developed in Vietnam. The biggest difficulty right now was the absence of commercial specific antibodies against SRBSDV. To develop diagnostic techniques by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for SRBSDV detection, in a previous study, we created antibodies against SRBSDV from the 66 kDa recombinant SRBSDV protein P10 expressed in *E. coli*; the obtained antibodies had a titer of 1:5000 dilution. Here, we continued to produce polyclonal antibodies against SRBSDV from small antigenic peptide (PASTTDVTHYGGY) derived from the P10 envelope protein, which was conservative in Vietnamese SRBSDV population. Titer of the purified IgG antibody was examined using Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) which showed a titer of 1:40000 dilution. The specific binding between anti-peptide IgG antibodies diluted at 1:40000 and the recombinant P10 protein in *E. coli* extraction was confirmed by using western blotting. In Dot-ELISA, our antibodies could distinguish between the SRBSDV-infected and non-infected rice samples. Our research results open up a new opportunity for developing the rapid diagnosis Southern rice black-striking dwarf virus membrane-type kit in Vietnam.

Keywords: P10 protein, polyclonal antibody, rice, Southern rice black-striking dwarf virus disease.