

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HCM



Báo cáo chuyên đề:

PROTEIN TÁI TỔ HỢP VÀ VIRUS GUMBORO

Giáo viên hướng dẫn: Nguyễn Ngọc Hải

Sinh viên thực hiện: Nguyễn Phan Thành

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Virus Gumboro hay còn gọi là Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) là virus ARN sợi đôi, gây viêm túi Fabricius, xuất huyết cơ, hư hại thận thể cấp ở gà. Làm chậm tăng trưởng, gây suy giảm miễn dịch, tạo tỉ lệ chết khoảng 5-20% (nhiều thống kê cho rằng lên đến 60-100% đàn gà nuôi). Virus lây lan rất nhanh qua nhiều đường. Việc kiểm soát và phòng bệnh là rất khó khăn, đặc biệt khi các chủng mới của IBDV xuất hiện làm cho vaccine phòng bệnh trở nên kém hiệu quả (nhiều nơi vaccine đã bị mất tác dụng). Vì vậy vấn đề tìm hiểu về IBDV cũng như tìm ra loại vaccine mới để thay thế là rất quan trọng.

II. TỔNG QUAN

1. Virus Gumboro – Infectious Bursal Disease Virus (IBDV)

1.1. Lịch sử:

Năm 1962, Cosgrove đã phát hiện và mô tả một bệnh mới, xuất hiện ở thành phố Gumboro, vùng Delaware ở Hoa Kỳ. Bệnh thường thấy trên gà con với bệnh tích thường gặp chủ yếu ở thận và túi Fabricius.

Lúc đầu, người ta cho rằng, bệnh là biến thể của bệnh viêm phế quản truyền nhiễm (Infectious Bronchitis, IB) vì bệnh tích ở thận tương đối giống nhau.

Sau này, Winterfield và Hitchner đã chứng minh rằng những con gà đã miễn dịch với IB rồi vẫn nhiễm bệnh viêm túi Fabricius.

Cuối năm 1962, Winterfield đã phân lập được từ phôi trứng tác nhân gây bệnh truyền nhiễm ở gà (bệnh tích ở túi Fabricius và thận).

Năm 1986-1987, lần đầu tiên những dòng biến thể của IBDV được công bố.

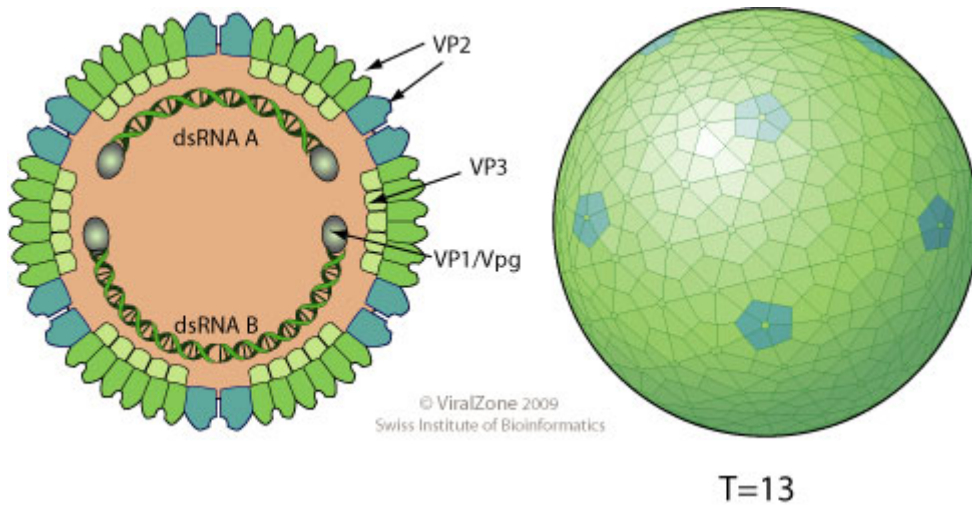
Năm 1987, sự nguy hiểm của IBDV lần đầu tiên được công bố tại Belgium và The Netherlands.

Năm 1970, Hitchner đề nghị tên chính thức cho bệnh này là Infectious Bursal Disease (IBD) hay còn gọi là Gumboro. Virus gây bệnh là Infectious Bursal Disease Virus (IBDV).

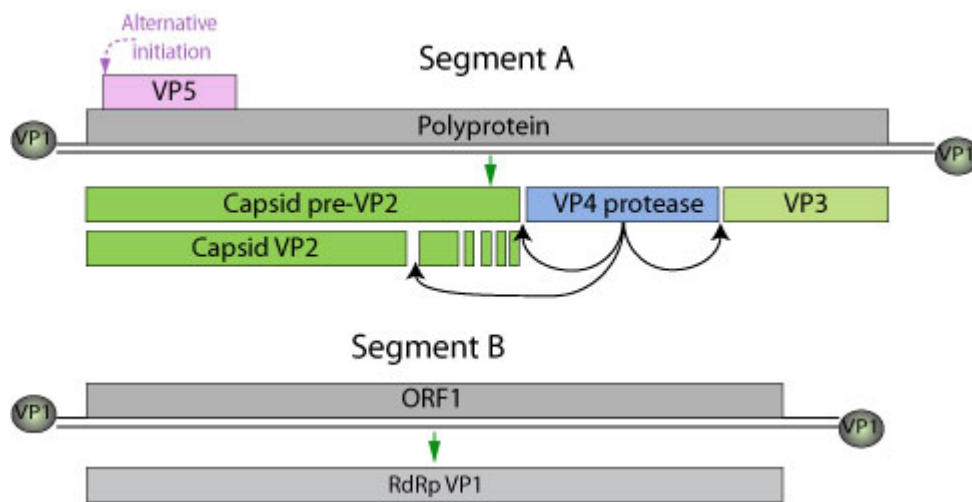
1.2. Đặc điểm cấu trúc:

Thuộc họ Birnaviridae, có kích thước khoảng 55-65nm, phân tử khối 2.10^6 Dalton (Nick, 1976). Bộ gen gồm hai đoạn ARN sợi đôi (đoạn nhỏ B và đoạn lớn A), có kích thước khác nhau, khoảng 2800 và 3400 bp (nên mới gọi là Birnavirus). Virion không có vỏ capsid, có cấu trúc đối xứng khối 20 mặt, được cấu thành bởi 32 capsomer tạo thành 5 protein có khối lượng phân tử lần lượt là 90, 41, 32, 28, 17 kD. Đoạn nhỏ (segment B) mã hóa VP1-là ARN polymerase của virus. Polypeptide này hiện diện trong virus nghỉ ở ngoài tế bào chủ (virion), mang bản chất của một protein tự do và protein liên kết genome (còn được gọi là VPg) VPg được cố định vào đuôi 5' của sợi dương của 2 mạch trong genome (Dobos, 1993). Đoạn lớn (segment A) có hai khung đọc mở (ORF- Overlapping open Reading Frame). Khung lớn là một monocistron mã hóa một tiền protein 110 kD được phân cắt thành 3 là VP2, VP3, VP4. VP2 và VP3 là protein cấu trúc chính, trong đó VP2 được coi là kháng nguyên bảo vệ (host protective antigen) đồng thời là kháng nguyên đặc hiệu type (serotype specific antigen) và chịu trách nhiệm cảm ứng tạo kháng thể trung hòa. VP3 là kháng nguyên đặc hiệu nhóm (group specific antigen) của 2 serotype và chỉ được phát hiện bởi các kháng thể không trung hòa (non-neutralising antibodies) trong phản ứng chéo giữa serotype 1 và serotype 2. VP4 là protease của virus tham gia vào quá trình phân cắt polyprotein (cắt serine-lysine).

Khung nhỏ sẽ mã hóa cho protein không cấu trúc VP5, không cần thiết cho quá trình sao chép virus *in vitro* nhưng lại quan trọng đối với khả năng gây bệnh của virus (Mundt *et al.*, 1997)



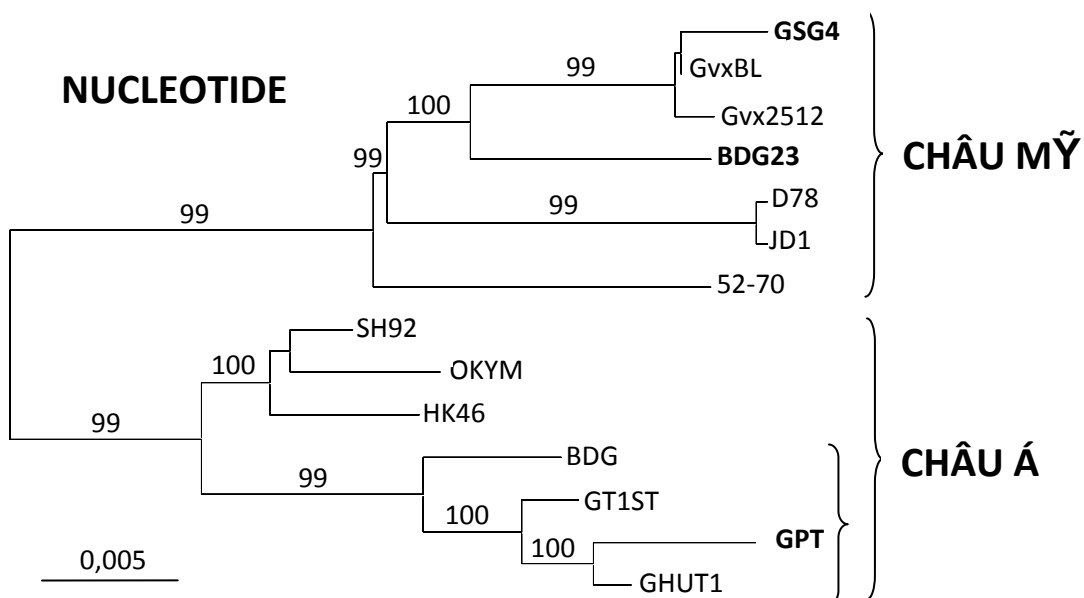
Hình 1: Cấu trúc virus Gumboro (expasy.org)

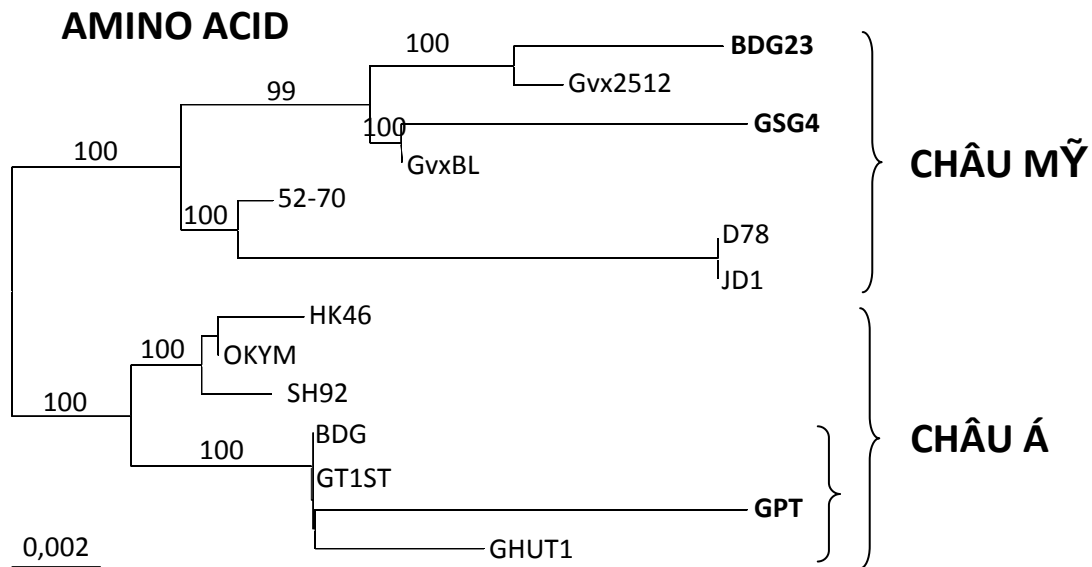


Hình 2: Cấu trúc genome của virus Gumboro (expasy.org)

1.3. Đặc điểm kháng nguyên miễn dịch

Có hai serotype virus Gumboro khác nhau ở trọng lượng các đoạn ARN và các quyết định kháng nguyên trên VP2: serotype 1 gây bệnh ở gà và serotype 2 không gây bệnh. Hai serotype được phân biệt bằng phản ứng trung hòa (VN) mà không thể phân biệt được bằng phản ứng kháng thể huỳnh quang hoặc ELISA. Gây miễn dịch bằng serotype 2 không bảo vệ gà khi gây nhiễm bằng virus serotype 1. Bằng kỹ thuật huyết thanh học (VN và MCA-monoclonal antibodies) người ta phát hiện ở Mỹ có nhiều biến chủng khác với chủng cổ điển của serotype 1 (Rosenberger, 1985). Các virus vaccine hiện hành thuộc chủng cổ điển không tạo được miễn dịch đầy đủ đối với các biến chủng này. Các virus có độc lực cao được phát hiện lần đầu ở Bỉ, Hà Lan và một số nước khác của châu Âu (1987). Và ở châu Á, bệnh gây tỉ lệ chết cao và có cấu trúc kháng nguyên tương tự serotype 1 cổ điển. Ở Việt Nam, các nhà khoa học đã phân lập được một số chủng cường độc thuộc serotype 1 (Lê Thanh Hòa và ctv 1992).





Hình 3: Mối quan hệ phả hệ và nguồn gốc giữa các chủng BDG23 (chủng thu thập ở Bình Dương), GPT (chủng thu thập ở Phúc Thọ) và các chủng châu Á, châu Mỹ (sử dụng chương trình MEGA4.0, 1000 bootstrap) (Lê Thị Kim Xuyên, Lê Thanh Hòa, 2008)

Protein VP2 và VP3 có những điểm quyết định kháng nguyên kích thích cơ thể sinh những kháng thể. Ở gà mẹ, kháng thể sẽ được truyền sang gà con cho đến 3-4 tuần tuổi. Virus Gumboro được biết như là một nguyên nhân gây suy giảm miễn dịch trên gà con.

Các virus Gumboro không gây bệnh cho người và các động vật khác. Virus Gumboro có thể nuôi cấy trên phôi gà và môi trường tế bào có nguồn gốc từ gà như CEF (chicken embryo fibroblast), CEK (chicken embryo kidney), CEB (chicken embryo bursa) và các dòng tế bào của động vật hữu nhũ (MA-104, Vero, BGM-70).

Khi nuôi cấy virus vào màng CAM phôi gà 10 ngày tuổi, phôi chết sau 3-5 ngày với bệnh tích phù vùng bụng, xung huyết dưới da và có xuất huyết ở lỗ chân lông. Sung lách và hoại tử gan là bệnh tích đặc trưng của một số biến chủng virus Gumboro. Khi nuôi cấy trên môi trường tế bào, chu kỳ phát triển ở tế bào thai gà từ 10 đến 36 giờ, đối với các tế bào động vật hữu nhũ thì thời gian chậm hơn (48 giờ). Biến đổi bệnh lý tế bào (CPE) xuất hiện trong khoảng 48 đến 96 giờ tùy thuộc vào chủng Gumboro. Đặc trưng CPE của virus Gumboro là thâm tế bào trở nên lỏng lẻo, các tế bào trở nên lỏng lẻo, các tế bào co tròn, tách ra khỏi thành chai, treo lơ lửng trong môi trường.

9. Bệnh Gum-bô-rô (Bệnh suy giảm miễn dịch ở gà)

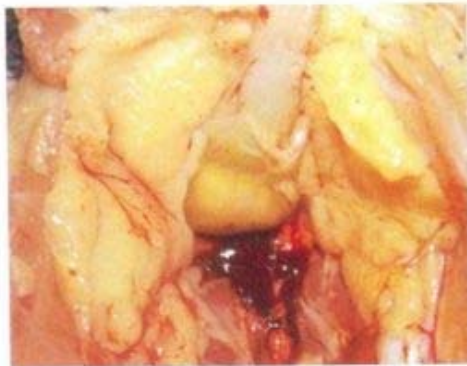
9. Infectious Bursal Disease of Chickens



1) Gà bệnh suy nhược và lờ đờ
1) Depression and prostration of chickens



2) Bệnh tiêu chảy phân trắng ở gà
2) Whitish watery diarrhea.



3) Túi Fabricius sưng phù nề và chuyển màu vàng.
3) Edematous swelling and yellowness of the bursa Fabricius.



4) Túi Fabricius sưng to, niêm mạc sung huyết hoặc xuất huyết.
4) Enlargement of the bursa Fabricius and congestions or hemorrhages of the mucosa.

1.4. Sức đề kháng

Có sức đề kháng khá lớn. Có thể sống sót trong những điều kiện chăn nuôi và khí hậu rất khác nhau. Có thể sống bốn tháng trong điều kiện chăn nuôi bình thường. Ở 56°C có thể tồn tại 5 giờ, ở -58°C trong 18 tháng mà độc lực không suy giảm. Chỉ bị vô hoạt ở pH = 12 nhưng chịu được pH = 2.

Trong chất thải, phân, nước tiểu,... IBDV vẫn giữ nguyên tính gây nhiễm và gây bệnh trong vòng ít nhất là 52 ngày.

IBDV đề kháng hoàn toàn với ether, chloroform. IBDV có thể tồn tại trong phenol 0,5% và timerosal 1,125% ở 50°C trong 1 giờ, formalin 0,5% trong 6 giờ, chloramin 0,5% trong 10 phút. Thuốc sát trùng chloramin T, formol (1-2%) phun lên nền chuồng có thể diệt được virus.

1.5. Truyền nhiễm học

1.5.1. Loài mắc bệnh

Các dòng gà đều mắc, thường trên dòng Leghorn. Tuổi gà cảm thụ 2-15 tuần nhưng thường 3-6 tuần bị nặng hơn. Nhỏ hơn 3 tuần tuổi thường bị nhiễm ở thể ẩn đưa đến ức chế miễn dịch. Gà tây, gà nhà, vịt, ngỗng, cút có thể nhiễm nhưng không biểu hiện bệnh.

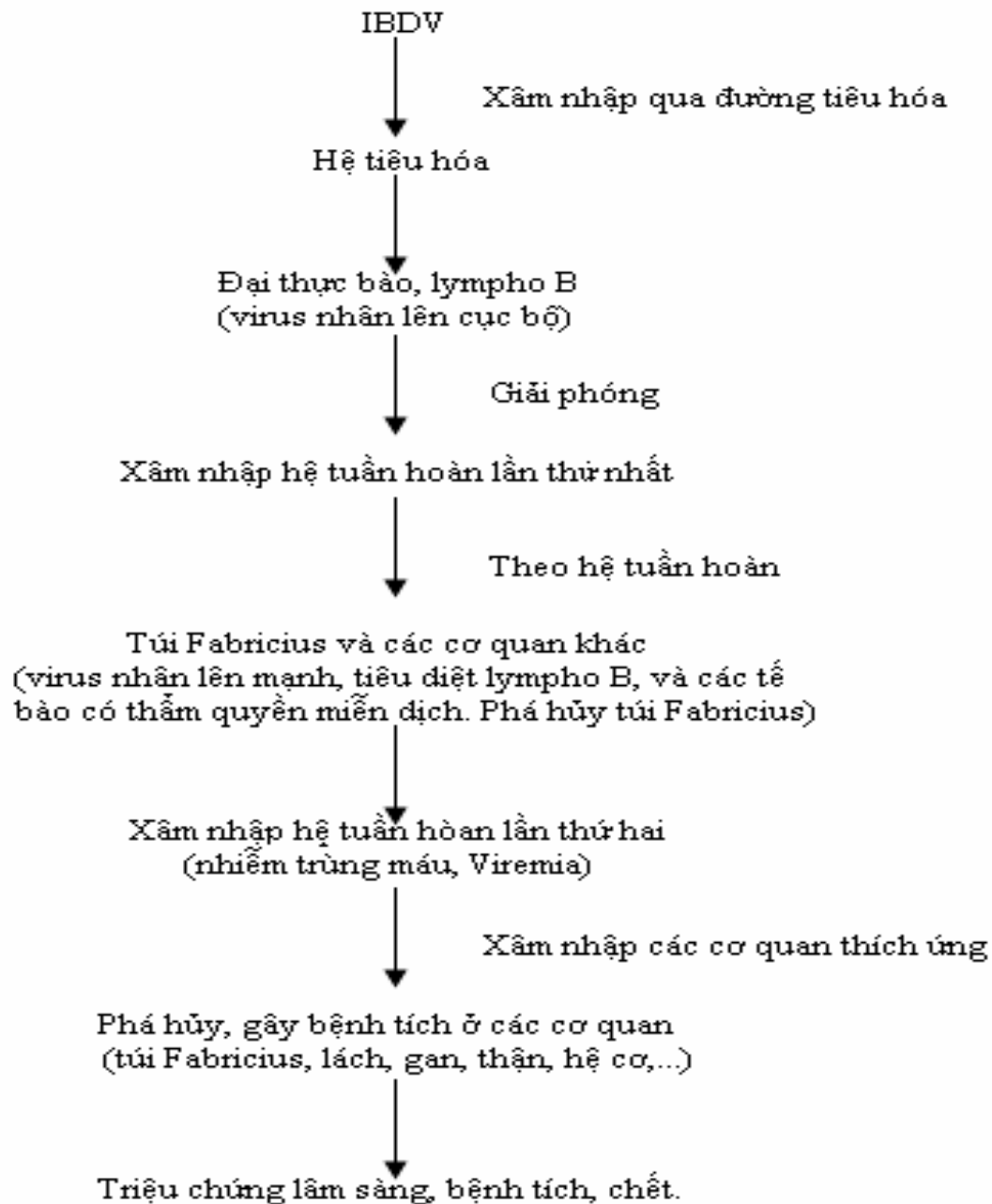
1.5.2. Đường xâm nhập và sự lây lan

Xâm nhập chủ yếu qua đường tiêu hóa, ngoài ra còn qua đường hô hấp. Có thể lây trực tiếp từ con này qua con khác hoặc lây qua thức ăn, nước uống hoặc tiếp xúc với môi trường nhiễm bệnh. Nhưng gà lướt qua bệnh đóng vai trò vật mang virus thầm lặng. Không lây qua trứng. Gà con mới nở bị nhiễm có thể do virus dính ngoài vỏ trứng

1.5.3. Cơ chế làm suy giảm miễn dịch

Virus chọn túi Fabricius làm cơ quan đích (túi Fabricius là cơ quan miễn dịch cao nhất tạo điều kiện cho lympho B thành thực mang kháng thể IgM và trở thành các tế bào tiết kháng thể khi các tế bào này nhận được tín hiệu từ kháng nguyên. Nhưng túi Fabricius chỉ nhận được tín hiệu ấy khi các nang lympho trong túi còn nguyên vẹn. Do virus phá hủy túi một cách trầm trọng nên chức năng miễn dịch của túi bị mất một phần hay toàn bộ. Người ta gọi hiện tượng mất chức năng miễn dịch là hiện tượng suy giảm miễn dịch.

Gà cảm nhiễm quá sớm với virus Gumboro thì rất dễ thụ cảm đối với viêm phế quản truyền nhiễm, viêm thanh khí quản truyền nhiễm, thương hàn,...



Sơ đồ: CƠ CHẾ NHÂN LÊN-SINH BỆNH CỦA IBDV

1.6. Các phương pháp sinh học phân tử phát hiện virus Gumboro

1.6.1. Kỹ thuật kháng thể huỳnh quang

Nguyên lý: Dùng một chất đánh dấu (chất màu huỳnh quang) gắn vào kháng thể hoặc kháng nguyên để phát hiện ra kháng nguyên hoặc kháng thể tương ứng chưa biết ở mức vi thể dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Gồm hai phương pháp trực tiếp và gián tiếp.

1.6.2. Phản ứng kết tủa khuếch tán trên thạch (*Agar gel precipitation test, AGP*)

Nguyên lý: Sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên hòa tan và kháng thể tương ứng xảy ra hình thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể, phức hợp kháng nguyên-kháng thể đạt được mức độ nhất định thì có sự bảo hòa, lúc này sẽ xảy ra hiện tượng kết tủa.

Nếu thiếu hoặc thừa 2 thành phần này thì sự kết tủa khó xảy ra. Sự kết tủa này biểu hiện bằng chất cặn màu trắng xám trông rất rõ. Sự kết tủa này đòi hỏi điều kiện nhiệt độ, pH thích hợp, có chất điện giải.

1.6.3. RT-PCR

Nguyên tắc: Phát hiện trên gel điện di bộ gene của IBDV sau khi khuếch đại đoạn cDNA được phiên mã ngược từ RNA của virus.

1.6.4. RFLP

Nguyên lý: Dùng cDNA hoặc DNA trong genome như mẫu dò để phát hiện các đoạn DNA có độ dài khác nhau được tạo ra sau khi cắt đoạn DNA genome của mẫu nghiên cứu và phân tích bằng điện di trên gel.

1.6.5. Phương pháp trung hòa virus (Virus Neutralization-VN)

Nguyên lý: Khi trộn virus với huyết thanh miễn dịch tương ứng thì nó sẽ bị ứng chế và không gây độc cho tế bào.

1.6.6. ELISA

Phát hiện mầm bệnh hay kháng thể dựa trên phản ứng đặc hiệu của kháng nguyên kháng thể.

2. Protein tái tổ hợp (recombinant protein)

Protein tái tổ hợp là protein được tạo ra từ những đoạn DNA tái tổ hợp. Đối với Gumboro, protein tái tổ hợp thường là VP2 tái tổ hợp. Do protein này được coi là kháng nguyên bảo vệ, đồng thời là kháng nguyên đặc hiệu type và chịu trách nhiệm cảm ứng tạo kháng thể trung hòa.

Trong chẩn đoán, VP2 tái tổ hợp sẽ được sử dụng như kháng nguyên cố định trên giá thể trong các test kháng nguyên-kháng thể (như ELISA) dùng cho việc chẩn đoán bệnh hay nghiên cứu. Trong phòng bệnh, VP2 tái tổ hợp cũng được sử dụng như một kháng nguyên trong vaccine, để kích thích cơ thể gà tạo kháng thể để phòng bệnh. Ngày nay đã có nhiều nghiên cứu về việc biểu hiện của gene mã hóa VP2, trong bài báo cáo này tôi xin trình bày hai nghiên cứu: cloning và sự biểu hiện của gene VP2 của IBDV trong những tế bào eukaryotic (nhóm nghiên cứu người Iran); biểu hiện protein VP2 trong baculovirus, sử dụng trong chẩn đoán (Jackwood và ctv).

2.1. Cloning và sự biểu hiện của gene VP2 của IBVD trong những tế bào eukaryotic

IBDV là chủng virus gây thiệt hại nặng cho ngành chăn nuôi gia cầm, đặc biệt khi các dòng IBDV mới xuất hiện thì vaccine sử dụng virus nhược độc dạng cũ đã không còn hiệu quả nữa. Để khắc phục nhược điểm này, nhiều nghiên cứu đã được thực hiện để phát triển một vaccine mạnh hơn, dựa trên công nghệ DNA tái tổ hợp.

Để làm được điều đó, trong nghiên cứu của mình nhóm tác giả người Iran sử dụng đoạn cDNA VP2 trong plasmid (pTZ57RVP2) trong E.coli chủng TOP10F để khuếch đại đoạn cDNA VP2 dùng cho cloning. Vector nhận là vector biểu hiện pCDNA4 (vì vector này được thiết kế đặc biệt cho việc biểu hiện protein trong các tế bào nhân chuẩn, dài 5,3 Kb chứa promoter CMV, gene kháng ampicillin, gen kháng zeocin, đuôi upstream histidin để sàng lọc protein). Dòng tế bào nhận là COS-7 (một nguyên bào sợi). Các enzyme cắt được sử dụng là EcoRI, XbaI và ligated.

Quá trình nghiên cứu như sau

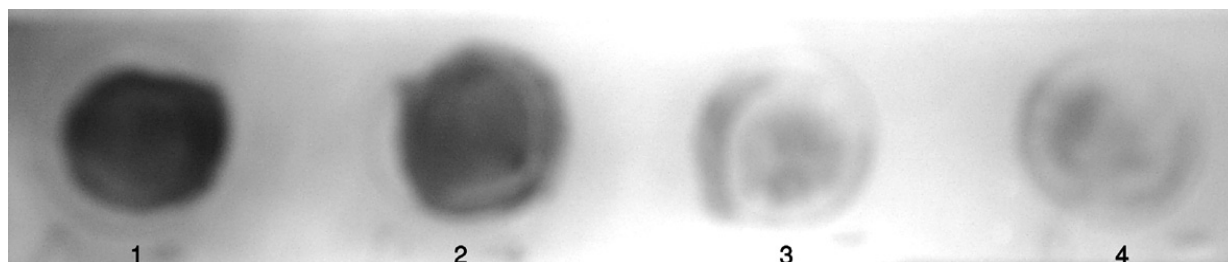
2.1.1 Khuếch đại đoạn gene chứa cDNA VP2

DNA plasmid pTZ57RVP2 được chiết xuất từ E.coli bởi Roche Plasmid Mini Kit. Cặp mồi được sử dụng: mồi xuôi (5'GCCGGAATTCATGACAAACCTGCAAGAT-3') và mồi ngược (5'GCCGTCTAGAAACCTTATGGCCCGGAT-3'). Các chu kỳ PCR đã được thiết lập như sau: ban đầu ở 100°C trong 5 phút để biến tính, tiếp theo là 30 chu kỳ của quá trình khuếch đại tại 95 ° C trong 1 phút, bắt cặp mồi và DNA plasmid ở 58°C trong 1 phút và kéo dài chuỗi ở 72°C trong 1 phút. Đoạn VP2 khuếch đại (1365bp) và vector pCDNA4 đã được cắt với EcoRI, XbaI và ligated sau khi thanh lọc từ 1% agarose gel.

2.1.2 Biểu hiện gene mã hóa VP2

Các đoạn gene VP2 sau được khuếch đại sẽ được chuyển vào pCDNA4 rồi chuyển tiếp vào COS-7 để biểu hiện protein. Dòng COS-7 được chuyển gen sẽ được nuôi cấy trong Dolbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), bổ sung 10% FBS, duy trì ở 37°C và CO₂ 5%.

Để xác định sự biểu hiện protein, các tế bào được duy trì ở môi trường như trên và bổ sung thêm zeocin trong 24 giờ để lựa chọn. Sau khi lựa chọn với kháng sinh, các tế bào còn lại sẽ được ủ trong 24 giờ để VP2 biểu hiện tối đa. Thu lấy tế bào và tiến hành đông băng-tan băng 3 lần để phá vỡ tế bào. Protein VP2 tái tổ hợp trong dung dịch sau khi phá vỡ tế bào được phát hiện bằng phương pháp dot blotting, với huyết thanh gà chống IBDV (độ pha loãng 1:50), huyết thanh dê kháng huyết thanh gà IgG (H + L), peroxidase liên hợp (độ pha loãng 1:30) và 4-chloro-1 Naphtol.



Hình 5: Kết quả dot blotting. 1 và 2 là từ tế bào có chứa vector biểu hiện mang gene VP2. 3 và 4 là từ tế bào không có vector biểu hiện mang gene VP2.

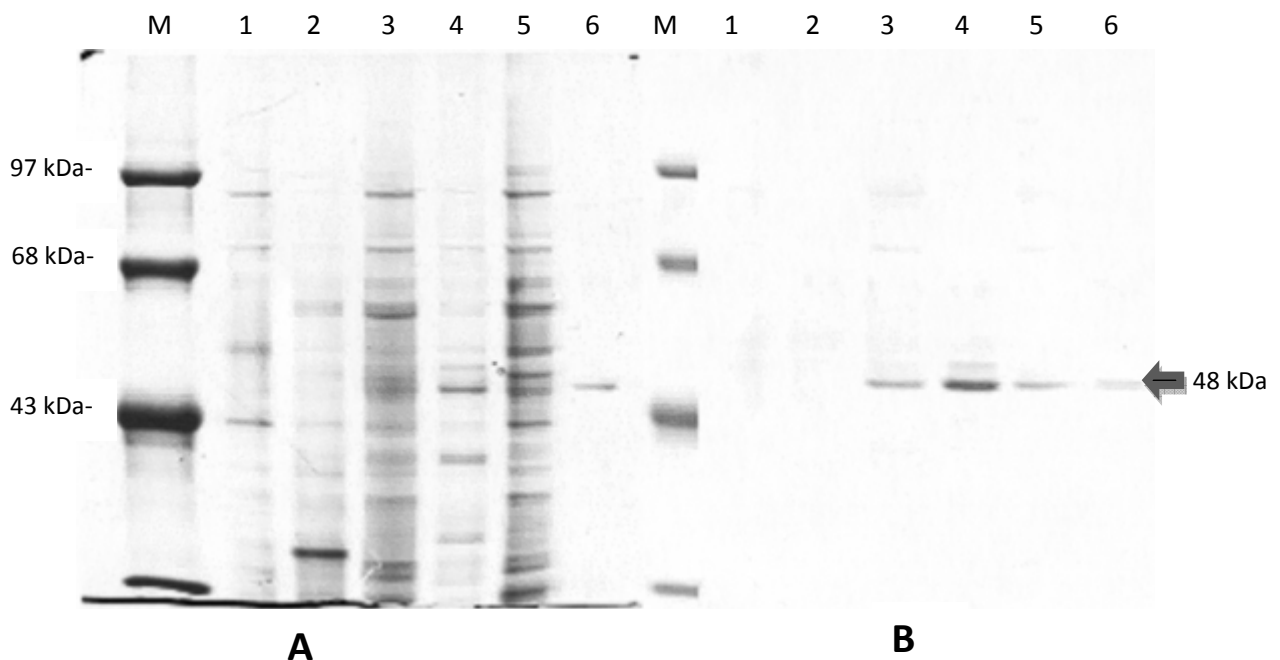
2.2. Biểu hiện protein VP2 trong baculovirus, sử dụng trong chẩn đoán

Thí nghiệm sử dụng vector p360v17 làm vector mang gene mã hóa VP2 để chuyển vào baculovirus. Nghiên cứu thực hiện trên cả ba chủng baculovirus: 9A5, 6A3 và chủng hoang dại. Kết quả cho thấy rằng: protein được sinh ra từ cả ba chủng đều có kích thước như nhau và đều bằng 56,7 kDa (có sự khác biệt với một

số nghiên cứu khác-như nghiên cứu của Toh-Kyung Kim và Sang-Geon Yeo cho thấy protein tái tổ hợp VP2 được tạo ra từ *Spodoptera frugiperda* với vector biểu hiện pFastBacHTa chỉ khoảng 48 kDa)

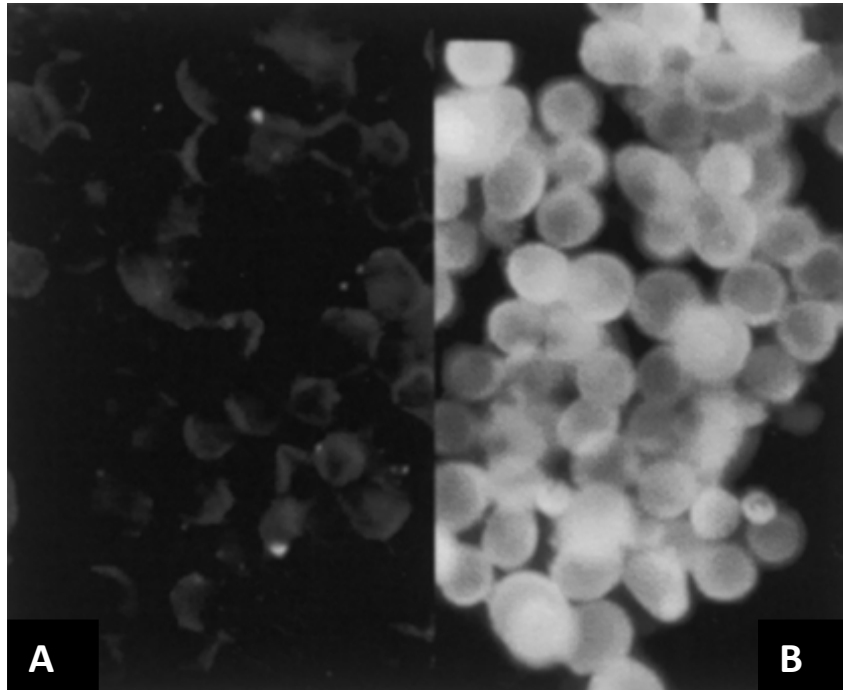
Nghiên cứu đã tiến hành sử dụng VP2 tái tổ hợp nhằm phát hiện kháng thể kháng IBDV. Bằng cách cố định VP2 tái tổ hợp trên các hạt resin, nghiên cứu đã cung cấp một kit phát hiện nhanh kháng thể trung hòa IBDV trong chẩn đoán.

Ngoài hai nghiên cứu trên còn rất nhiều nghiên cứu khác về sự biểu hiện của gene mã hóa protein VP2 của IBDV trong eukaryotic lẫn prokaryotic. Nhưng do còn hạn chế trong khả năng tìm kiếm thông tin, nên chưa biết được đã có vaccine protein tái tổ hợp nào được sản xuất để phòng virus Gumboro hay chưa. Đó cũng chính là hạn chế của bài báo cáo này.



Hình 6: Phát hiện protein VP2 (48 kDa) biểu hiện DNA VP2 tái tổ hợp từ bacmid trong tế bào *Spodoptera frugiperda* bởi SDS-PAGE (A) và Western blotting với huyết thanh gà kháng IBDV (B): 1 và 2 là protein từ tế bào không mang vector tái

tổ hợp; 3, 4, 5 và 6 là protein từ tế bào mang vector tái tổ hợp. (Toh-Kyung Kim và Sang-Geon Yeo, 2003)



Hình 7: Phát hiện sự biểu hiện protein từ gene VP2 nhờ vector bacmid trong tế bào *Spodoptera frugiperda* bằng kiểm tra với kháng thể phát huỳnh quang: A tế bào không mang vector tái tổ hợp, B tế bào mang vector tái tổ hợp. (Toh-Kyung Kim và Sang-Geon Yeo, 2003)

III. KẾT LUẬN

Với những hậu quả nghiêm trọng mà virus Gumboro gây ra cho ngành chăn nuôi và chế biến gia cầm, thì việc phòng và chẩn đoán bệnh nhanh là hết sức cần thiết. Vì vậy vấn đề nghiên cứu, sản xuất và sử dụng protein tái tổ hợp VP2 cần phải được đẩy mạnh hơn nữa.

Vaccine chứa protein VP2 tái tổ hợp đã giúp khắc phục những khuyết điểm của dòng vaccine sống. Hay protein tái hợp dùng để chẩn đoán bệnh giúp phát hiện nhanh gia cầm bị bệnh nhằm có biện pháp cách ly kịp thời là những hướng đi đúng đắn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Website:

www.Gumboro.com

www.Expasy.org

www.thuvienkhoahoc.com

Nguyễn Bá Thành, Khảo sát bệnh Gumboro và thử nghiệm bốn quy trình tiêu phòng trên gà thịt Arbor Acres nuôi tại thị xã Thủ Dầu Một-tỉnh Bình Dương, luận án thạc sỹ thú y, trường đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh, 1999.

Đặng Mai Tuyết Trang, Khảo sát miễn dịch thu được chống Gumboro và Newcastle trên gà ISA-Brown 1-6 tuần tuổi, luận văn tốt nghiệp khoa chăn nuôi thú y, trường đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh, 1996.

Lê Thị Kim Xuyên và Lê Thanh Hòa, Phát hiện các chủng cường độc Gumboro nguồn gốc Âu-Mỹ tại Việt Nam bằng phương pháp sinh học phân tử phân tích gene VP2, tạp chí Khoa học và Phát triển tập VI số 5, 2008.

Toh-Kyung Kim and Sang-Geon Yeo, Expression of VP2 gene protein of IBDV detected in Korea, Gyeongsang National University, South Korea, 2003.

Roosbeh Hushiarian and *et al*, Cloning and expression of VP2 gene of IBDV in eukaryotic cells, Iranian journal of biotechnology Vol 5 No 4, 2007.

Jackwood and *et al*, IBDV VP2 fusion protein expressed by baculovirus, use as diagnostic, 1995.

MỤC LỤC

I. Đặt vấn đề	3
II. Tổng quan	3
1.....	Vi
rus Gumboro	3
1.1. Lịch sử	3
1.2. Đặc điểm cấu trúc	4
1.3. Đặc điểm kháng nguyên miễn dịch	6
1.4. Truyền nhiễm học	9
1.5. Sức đề kháng.....	9
1.6. Các phương pháp sinh học phân tử phát hiện virus Gumboro	12
2.....	Pr
otein tái tổ hợp	13
2.1. Cloning và sự biểu hiện của gene VP2 của IBDV trong những tế bào eukaryotic	13
2.2. Biểu hiện protein VP2 trong baculovirus, sử dụng trong chẩn đoán	15
III. Kết luận	17
Tài liệu tham khảo	18