TẠO KHÁNG THỂ ĐA DÒNG NHẬN BIẾT PROTEIN P9 CỦA VI RÚT LÙN SỌC ĐEN PHƯƠNG NAM BẰNG ĐOẠN PEPTIDE TỔNG HỢP

Nguyễn Duy Phương[1], Nguyễn Anh Minh[1], Phạm Thu Hằng[1],
Phạm Thị Vân[1], Nguyễn Thị Thu Hà[1], Phạm Xuân Hội[1], Đỗ Thị Hạnh[2]

TÓM TẮT

Bệnh lúa lùn sọc đen do vi rút lùn sọc đen phương Nam (*Southern rice black-striked dwarf virus-SRBSDV*) đã gây dịch bệnh nghiêm trọng trên lúa với diện tích hàng triệu hecta tại các vùng trồng lúa ở phía Nam Trung Quốc và miền Bắc và Trung Việt Nam trong giai đoạn 2009-2011. Năm 2017, bệnh có dấu hiệu tái phát tại Thái Bình và một số vùng trồng lúa khu vực phía Bắc. Hệ gen của SRBSDV có chiều dài 29124 bp, gồm 10 phân đoạn RNA sợi đôi, có kích thước từ 1,8 đến 4,5 kb, được đánh số từ S1 đến S10. Trong đó, phân đoạn S9 có chiều dài 1899 bp tham gia tạo cấu trúc viroplasm, có vai trò trong quá trình tái sinh và lắp ráp phân tử virus trong tế bào ký chủ. Trong nghiên cứu này, đã xác định những đoạn peptide có kích thước nhỏ trên P9 vừa có tính bảo thủ cao với các mẫu SRBSDV của Việt Nam đã được giải trình tự vừa có tính kháng nguyên cao, đoạn peptide sau đó được sử dụng để tạo kháng thể. Kháng thể tinh sạch có hiệu giá 1:50.000, có thể phát hiện đặc hiệu sự có mặt của đoạn peptide có nguồn gốc từ protein P9 và SRBSDV trong các mẫu lúa nhiễm bệnh lùn sọc đen bằng kỹ thuật Dot-ELISA.

Từ khóa: *Bệnh lùn sọc đen phương Nam, kháng thể đa dòng, lúa, protein P9.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi rút lùn sọc đen phương Nam (SRBSDV) là một thành viên mới thuộc phân nhóm *Fijivirus* của họ *Reoviride,* phân bố chủ yếu ở các nước thuộc châu Á bao gồm Trung Quốc, Nhật Bản và Việt Nam và là một trong những vi rút gây bệnh hại nghiêm trọng trên cây lúa [3, 4, 6, 7, 13].

Bệnh lùn sọc đen phương Nam hại lúa (LSĐPN) được phát hiện lần đầu tiên ở Việt Nam vào năm 2009 và đã gây dịch hại nghiêm trọng trên hàng nghìn ha trồng lúa ở miền Bắc và miền Trung. Vụ hè thu năm 2017, bệnh LSĐPN do SRBSDV tái bùng phát sau 8 năm. Viện Bảo vệ thực vật đã ghi nhận sự hiện diện của bệnh qua một số mẫu lúa nhiễm bệnh gửi về từ các tỉnh, thành: Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Bình, Hải Phòng, Ninh Bình, Nam Định, Thái Bình, Vĩnh Phúc và Phú Thọ. Tỉnh Thái Bình sau đó đã công bố dịch [2]. Cho tới nay, việc phát triển giống lúa kháng SRBSDV vẫn chưa sẵn sàng nên biện pháp quản lý bệnh lúa lùn sọc đen vẫn chủ yếu nhằm vào kiểm soát nguồn bệnh và đặc biệt rầy lưng trắng.

Hệ gen của SRBSDV có chiều dài 29124 bp, gồm 10 phân đoạn RNA sợi đôi (từ S1 đến S10), có kích thước từ 1,8 đến 4,5 kb. Dựa vào mức độ bảo thủ protein, hiện nay mới chỉ có 5 phân đoạn được dự đoán chức năng là S1, S7, S8, S9 và S10. Trong số 5 phân đoạn được dự đoán chức năng này, 3 phân đoạn S7, S9 và S10 có mức độ bảo thủ cao, tỷ lệ đương đồng đạt trên 80% so với các loài khác trong nhóm 2 của chi *Fijivirus* [9, 13, 15, 16]. Các nghiên cứu trên protein P9-1 của SRBSDV cho thấy protein này là thành phần chủ chốt của viroplasm của virus. Protein P9-1 cũng tương tác với P6 và P5-1 để tạo cấu trúc viroplasm, có vai trò trong quá trình tái sinh và lắp ráp phân tử virus. Đáng chú ý, trong tế bào không phải là ký chủ của SRBSDV, chỉ mình P9-1 cũng có thể tự tương tác để tạo viroplasm [17, 18]. Đối với virus, theo lý thuyết bất kỳ một protein nào của virus đều có thể được sử dụng làm kháng nguyên. Trong nghiên cứu trước, chúng tôi đã tạo thành công kháng thể đa dòng kháng SRBSDV từ đoạn protein vỏ P10 tái tổ hợp cho phép phát hiện được SRBSDV trong mẫu lúa bệnh bằng kỹ thuật ELISA [8]. Dựa vào chức năng và tính bảo thủ của phân đoạn S9, đã tiếp tục nghiên cứu tạo kháng thể đa dòng kháng SRBSDV bằng đoạn peptide kích thước nhỏ giàu tính kháng nguyên có trình tự bảo thủ trên protein P9. Kháng thể tạo ra sẽ tiếp tục góp phần vào việc phát triển sản xuất kháng thể đặc hiệu kháng SRBSDV, tiến tới chủ

[1] Viện Di truyền nông nghiệp
[2] Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội
Email: xuanhoi.pham@gmail.com

động nguồn kháng thể để phát triển bộ kit chẩn đoán nhanh SRBSDV dạng màng.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Các mẫu bệnh lúa khỏe/nhiễm SRBSDV bằng lây nhiễm nhân tạo do Trung tâm Bệnh cây nhiệt đới, Học viện Nông nghiệp việt Nam cung cấp. Cụ thể, cây lúa khỏe ở giai đoạn 10 ngày tuổi được lây nhiễm với rầy lưng trắng nhiễm SRBSDV tuổi 3-4 ở mật độ 5-10 rầy/cây trong nhà lưới và chăm sóc cẩn thận. Các cây lúa lây nhiễm sau 20 ngày được kiểm tra RT-PCR để xác định chính xác cây nhiễm SRBSDV. Chuột bạch 6-8 tuần tuổi đặt mua từ Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương. Peptide tái tổ hợp dung hợp được đặt tổng hợp bởi Công ty GeneCreate (Trung Quốc).

Nghiên cứu được thực hiện tại Bộ môn Bệnh học phân tử, Viện Di truyền nông nghiệp trong thời gian 01/2019 – 12/2019.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Thiết kế đoạn peptide bảo thủ giàu tính kháng nguyên

Trình tự axit amin bảo thủ trên protein P9 của SRBSDV được phân tích bằng phần mềm BioEdit 2.0 dựa trên trình tự phân đoạn S9 của các chủng SRBSDV Việt Nam đã được công bố (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Đặc điểm tính ưa nước và khả năng nằm trên bề mặt phân tử của axit amin, vùng giàu tính kháng nguyên và có khả năng tạo cấu xoắn β trên phân tử protein P9 được phân tích bằng công cụ Antibody Epitope prediction (http://tools.immuneepitope.org/).

2.2.2. Gây kháng thể đa dòng trên chuột bạch

Quy trình gây miễn dịch trên chuột được thực hiện theo phương pháp của Amero và cộng sự (1994) [1]. Hai mươi µg protein tinh sạch được trộn đều với 200 µL tá dược và 200 µL đệm PBS (photphat kali 50 mM, pH 7,25, NaCl 150 mM). Hỗn hợp được tiêm vào chuột ở vị trí phúc mạc bụng. Sau 10 ngày, chuột tiêm nhắc lại một lần. Sau mỗi lần tiêm nhắc lại, huyết thanh chuột được thu trước mỗi lần tiêm nhắc lại để kiểm tra đáp ứng miễn dịch bằng phương pháp Dot-ELISA [12]. Khi chuột đạt đáp ứng miễn dịch cao nhất, toàn bộ máu chuột được thu để ly chiết huyết thanh. Thí nghiệm được thực hiện 3 lô, mỗi lô sử dụng 5 cá thể chuột (khối lượng 15 – 20 gram).

2.2.3. 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) theo phương pháp của Amero *et al.* (1994) [1]. Kháng huyết thanh chuột được chuẩn pH về giá trị 8,0 bằng cách thêm 0,1 thể tích Tris-HCl 1M, pH 8,0. Gel protein A-sepharose sau khi cho trương nở trong đệm PBS, pH 7,4 được nhồi vào cột (1 x 2 cm). Cột được cân bằng 10 mL đệm Tris-HCl 100 mM, pH 8. Các protein không hấp phụ trên gel (không gắn hoặc gắn không đặc hiệu) được rửa lần lượt bằng đệm Tris-HCl 100 mM và 10 mM, pH 8,0. Phần hấp thụ (gắn đặc hiệu) được đẩy ra bằng đệm glycin-HCl 100 mM, pH 3,0. Dịch ly giải được trung hòa về pH 8,0 bằng cách cho thêm 1/10 thể tích đệm Tris-HCl 1M, pH 8,0. Các phân đoạn tách ra qua cột được phân tích trên gel SDS-PAGE và lai thẩm tách miễn dịch [12].

2.2.4. Phương pháp Dot-ELISA

Màng PVDF được hoạt hóa bằng cách ngâm trong methanol trong 10 giây. Các dung dịch chứa protein đích (được chuẩn bị trong đệm PBS 1 X) được nhỏ trực tiếp lên màng. Màng được cố định bằng cách lắc nhẹ (30 phút –60 phút) trong dung dịch BSA 1% và được ủ lần lượt với kháng thể sơ cấp và kháng thể thứ cấp trong thời gian 1 giờ, ở 37°C. Các băng protein được hiện màu bằng cách ủ màng trong dung dịch cơ chất p-nitro blue tetrazolium chloridel 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP) pha trong đệm TBS pH 9,0 có $MgCl_2$ 5 mM. Phản ứng được ngừng bằng cách bổ sung đệm TBS có chứa EDTA 20 mM (đến khi vị trí nhỏ mẫu hiện rõ màu) [12].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

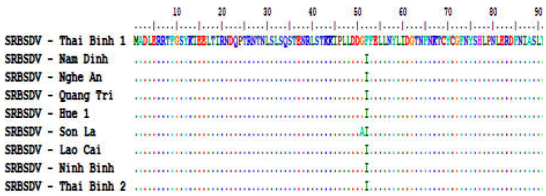
3.1. Xác định trình tự peptide bảo thủ giàu tính kháng nguyên của SRBSDV

Đối với virus, kháng nguyên phổ biến nhất là protein vỏ virus. Tuy nhiên, tính đặc hiệu của kháng thể chỉ được quyết định bởi một số vùng giàu tính kháng nguyên trên protein. Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là xác định trình tự peptide bảo thủ giàu tính kháng nguyên trên P9 của SRBSDV nhằm tăng tính đặc hiệu của kháng thể, phục vụ cho xét nghiệm SRBSDV bằng kỹ thuật kháng nguyên-kháng thể.

Để tạo kháng thể có khả năng nhận biết đặc hiệu protein P9 của các isolate SRBSDV Việt Nam,

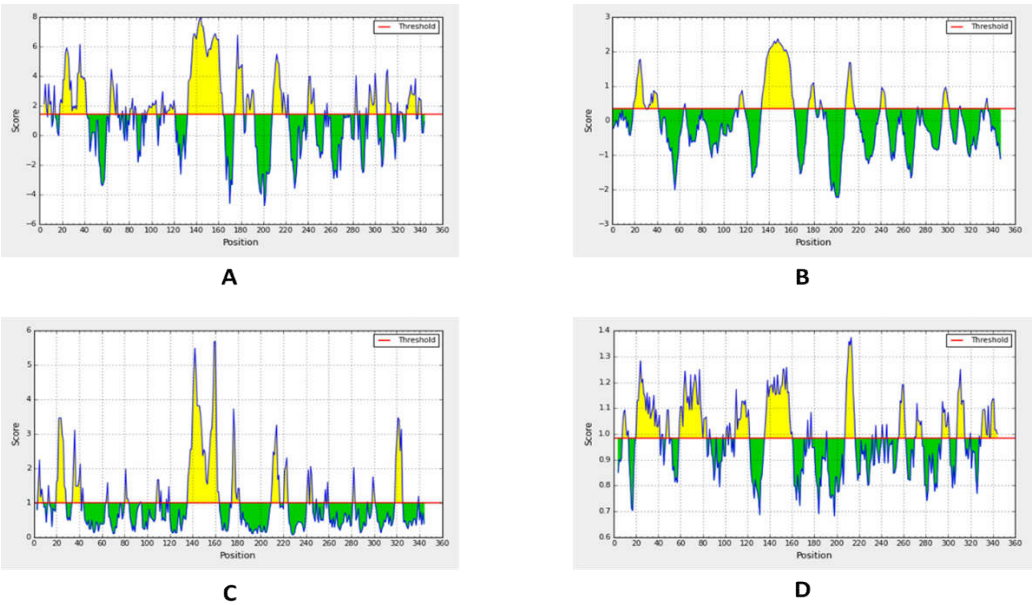
đoạn peptide được lựa chọn làm kháng nguyên gây đáp ứng miễn dịch theo tiêu chí (1) nằm trong vùng giàu tính kháng nguyên của protein P9 (có tính ưa nước, nằm trên bề mặt phân tử, có khả năng tạo cấu trúc xoắn β và tạo epitope) và (2) nằm trên vùng bảo thủ của protein P9.

Trong nghiên cứu trước, đã đánh giá đa dạng di truyền phân đoạn S9 của các isolate SRBSDV phân lập từ các vùng sinh thái trồng lúa khác nhau của Việt Nam [10]. Dựa trên các trình tự đã công bố, bằng phần mềm BioEdit 2.0, vùng bảo thủ trên protein P9 của các isolate SRBSDV Việt Nam đã được xác định thuộc vị trí từ 1-50 tính từ đầu C (Hình 1).



Hình 1. Một phần trình tự axit amin suy diễn trên protein P9

Ghi chú: Trình tự axit amin suy diễn của 9 isolate SRBSDV Việt Nam (Thai Binh 1 - KM576895, Nam Dinh - KM576887, Nghe An - KM576888, Quang Tri - KM576892, Hue 1 - KM576884, Son La - KM576893, Lao Cai - KM576886, Ninh Binh - KM576889, Thai Binh 2 - KM576896) được phân tích bằng phần mềm BioEdit 2.0. Dấu chấm thể hiện các axit amin giống nhau.



Hình 2. Dự đoán vùng peptide có tính kháng nguyên trên protein P9

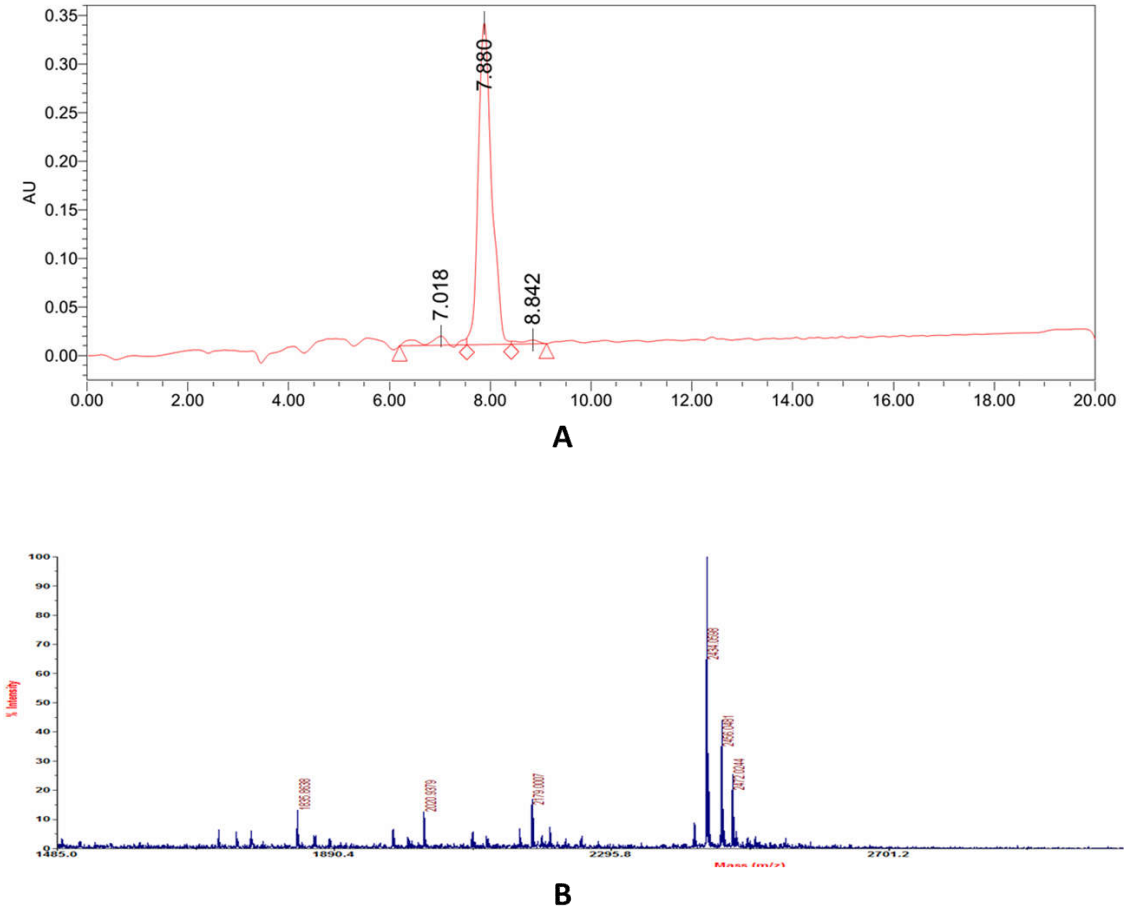
Ghi chú: Tính ưa nước (A), khả năng tạo epitope (B), khả năng nằm trên bề mặt phân tử (C) và khả năng tạo cấu trúc xoắn β (D) của các axit amin trên protein P9 được phân tích bằng công cụ Antibody Epitope prediction; đường màu đỏ thể hiện giá trị ngưỡng.

Vùng giàu tính kháng nguyên (epitope) là những vung polypeptide nằm trên bề mặt cấu trúc protein, có khả năng gây đáp ứng miễn dịch nên quyết định chất lượng kháng thể. Đoạn peptide giàu tính kháng nguyên trên protein P9 được lựa chọn bằng các công cụ Antibody Epitope prediction dựa trên các tiêu chí: (1) tập trung các axit amin ưa nước; (2) có khả năng nằm trên bề mặt phân tử; (3) có khả năng tạo cấu trúc xoắn β; (4) khả năng tạo epitope. Kết quả phân tích cho thấy trên protein P9, có 2 đoạn peptide thỏa mãn đồng thời 4 tiêu chí trên được xác định ở đầu C từ vị trí 20-39 và vị trí từ 138-160 (Hình 2).

Để đảm bảo các vùng peptide được chọn có tính bảo thủ trên tất cả các isolate SRBSDV đã phân lập ở Việt Nam, kết quả dự đoán tính kháng nguyên được kết hợp với kết quả phân tích đa dạng di truyền phân đoạn S9 (Hình 1). Tổng hợp các kết quả phân tích và dự đoán tính kháng nguyên, peptide ở vị trí 20-39 có

trình tự là RNDQPTRNTNLSLSQSTENR (đặt tên là P9.20-39) đã được chọn để tổng hợp kháng nguyên gây đáp ứng miễn dịch trên chuột.

Đoạn peptide giàu tính kháng nguyên P9.20-39 được đặt tổng hợp nhân tạo, sau đó phân tích độ tinh sạch bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC). Kết quả phân tích cho thấy peptide P9.20-39 có độ tinh sạch cao, sắc kí đồ cho một đỉnh duy nhất (Hình 3A). Kết quả phân tích khối phổ cũng cho thấy peptide P9.20-39 có khối lượng khoảng 2434,1 Da (Hình 3B), xấp xỉ kích thước dự đoán theo lý thuyết của đoạn peptide ban đầu. Kết quả này chứng tỏ đoạn peptide được tổng hợp đáp ứng yêu cầu cho thí nghiệm gây đáp ứng miễn dịch.



Hình 3. Tinh sạch peptide P9.20-39 bằng hệ thống sắc kí HPLC

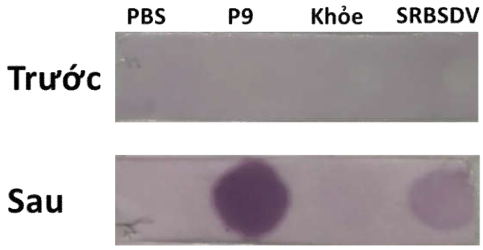
Ghi chú: (A) Sắc kí đồ tinh sạch peptide theo thời gian. (B) Phân tích khối phổ sản phẩm tinh sạch.

3.2. Gây đáp ứng miễn dịch trên chuột bạch

Để tăng tính kháng nguyên, đoạn peptide P9.20-39 được dung hợp với protein mang KLH (Keyhole limpet hemocyanin) kết hợp với việc bổ sung tá dược khi gây miễn dịch trên chuột. Sau 3 lần tiêm gây miễn dịch, 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.

Kết quả Dot-ELISA cho thấy kháng thể có trong huyết thanh chuột trước khi gây miễn dịch không có khả năng nhận ra hay phản ứng chéo với protein P9 tinh sạch (Hình 4, "Trước", cột 2), đồng thời cũng không phản ứng với dịch chiết mẫu lúa không nhiễm SRBSDV (Hình 4, "Trước", cột 3). Kháng thể có mặt trong kháng huyết thanh chuột sau 4 lần tiêm ở độ pha loãng 2.000 lần có khả năng nhận biết protein P9 trong mẫu protein tinh sạch (Hình 4, "Sau", cột 2) và cho kết quả dương tính với dịch chiết của mẫu lúa nhiễm SRBSDV (Hình 4B, "Sau", cột 4). Ngược lại, kháng huyết thanh không có phản ứng chéo với dịch chiết mẫu lúa không nhiễm SRBSDV (Hình 4B, "Sau", cột 3). Kết quả thu được bước đầu cho phép

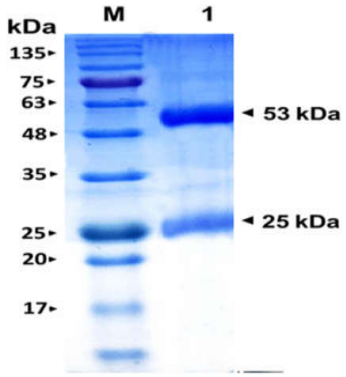
kết luận rằng việc gây kháng thể đa dòng kháng protein P9 bằng đoạn peptide giàu tính kháng nguyên P9.20-39 trên chuột bạch đã thành công, kháng huyết thanh thu được sau khi miễn dịch có chứa kháng thể kháng protein P9.



Hình 4. Kiểm tra đáp ứng miễn dịch của kháng huyết thanh bằng Dot-ELISA

Ghi chú: Mẫu kiểm tra huyết thanh chuột (1:2.000) được kiểm tra trước khi tiêm (Trước) và sau khi tiêm kháng nguyên (Sau). (PBS) Mẫu trống (không có protein); (P9) mẫu peptide P9.20-39; (Khỏe) dịch chiết mẫu lúa khỏe; (SRBSDV): dịch chiết mẫu lúa nhiễm SRBSDV.

3.3. Tinh sạch kháng thể IgG bằng sắc kí qua cột Protein A–sepharose



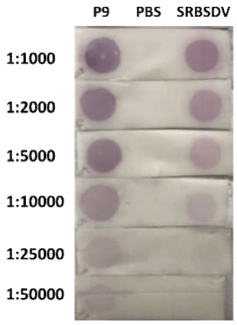
Hình 5. Tinh sạch kháng thể IgG bằng cột sắc kí protein A- sepharose

Ghi chú: Điện di SDS- PAGE kháng thể IgG sau khi tinh sạch qua cột protein A- sepharose; giếng M: thang chuẩn protein (Intron); giếng 1: phân đoạn E7 tinh sạch kháng thể IgG.

Hệ thống cột sắc kí ái lực protein A-sepharose đã được sử dụng để loại các protein không mong muốn trong kháng huyết thanh, nhằm thu được kháng thể IgG tinh sạch. Độ tinh sạch của kháng thể được được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE. Kết quả kiểm tra thu được 2 băng protein có kích thước khoảng 25 và 53 kDa (Hình 5, 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 bằng cột sắc kí ái lực protein A- sepharose.

3.4. Xác định hiệu giá và tính đặc hiệu của kháng thể

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. Trong nghiên cứu này, 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 1:1.000, 1:2.000, 1:5.000, 1:10.000, 1:25000, 1:50.000 và kiểm tra khả năng phát hiện protein đích trong mẫu dịch chiết cây lúa nhiễm SRBSDV và mẫu peptide P9.20-39 tinh sạch. 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: 50.000 đối với xét nghiệm mẫu peptide P9.20-39 tinh sạch (Hình 6, cột P9) và 1:25.000 đối với xét nghiệm dịch chiết cây lúa nhiễm SRBSDV (Hình 6, cột SRBSDV).

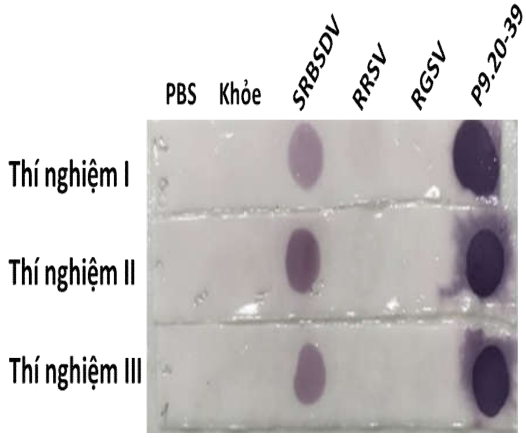


Hình 6. Đánh giá hiệu giá kháng thể IgG tinh sạch bằng Dot-ELISA

Ghi chú:Mẫu peptide P9.20-39 (P9) và dịch chiết mẫu lúa nhiễm SRBSDV được cố định trên màng PVDF và ủ với kháng thể IgG tinh sạch pha loãng tỉ lệ 1:1.000, 1:2.000, 1:5000, 1:10.000, 1:25.000 và 1:50.000. (PBS) Mẫu trống (không có protein).

Để chứng minh tính đặc hiệu của kháng thể tinh sạch thu được, mẫu dịch chiết từ các cây lúa nhiễm một số bệnh virus phổ biến trên lúa (vàng lùn, lùn xoắn lá và lùn sọc đen phương Nam) đã được sử dụng cho thí nghiệm lai miễn dịch, sử dụng kháng thể có độ pha loãng 1:2.000. Kết quả phân tích màng lai cho thấy kháng thể không phản ứng với dịch chiết mẫu lúa nhiễm virut vàng lùn và lùn xoắn lá, kết quả

lai thẩm tách miễn dịch không thu được đốm màu nào (Hình 7, RRSV, RGSV), kháng thể cũng không có phản ứng với mẫu lúa sạch bệnh (Hình 7, khỏe). Ngược lại, với mẫu P9.20-39 và mẫu lúa nhiễm SRBSDV, kết quả lai thẩm tách miễn dịch thu được đốm màu rất rõ ràng (Hình 7, P9.20-39, SRBSDV). Kết quả này chứng tỏ kháng thể (pha loãng 2.000 lần) có thể nhận biết một cách đặc hiệu kháng nguyên P9 và SRBSDV.



Hình 7. Đánh giá tính đặc hiệu của kháng thể IgG tinh sạch

Ghi chú: Mẫu xét nghiệm được cố định trên màng PVDF và ủ với kháng thể IgG tinh sạch (pha loãng tỉ lệ 1:2.000). (PBS) Mẫu trống (không có protein); (Khỏe) đối chứng âm (dịch chiết mẫu lúa sạch bệnh); (SRBSDV) dịch chiết mẫu lúa nhiễm bệnh lùn sọc đen phương Nam; (RRSV) dịch chiết mẫu lúa nhiễm bệnh lùn xoắn lá; (RGSV) dịch chiết mẫu lúa nhiễm bệnh vàng lùn; (P9.20-39) đối chứng dương (mẫu peptide P9.20-39). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần (Thí nghiệm I, II & III).

Cho đến nay, chỉ có Wang Z *et al.* (2012) công bố đã sản xuất thành công kháng thể đặc hiệu phát hiện SRBSDV bằng việc sử dụng 3 đoạn peptide có chiều dài 20 axit amin tương ứng nằm ở vị trí 20-39, 140-159, 319-339 trên trình tự của protein P10. Kháng thể thu được của Wang đạt hiệu giá 1:500.000 trong phân tích bằng phương pháp ELISA [14]. Trong một nghiên cứu trước, chúng tôi cũng đã sử dụng toàn bộ protein P10 của SRBSDV có chiều dài 557 axit amin, gây đáp ứng miễn dịch trên chuột và thu được kháng thể có hiệu giá 1:6.000 [8].

Dựa vào mức độ bảo thủ protein, hiện nay mới chỉ có 5 phân đoạn được dự đoán chức năng là S1, S7, S8, S9 và S10. Trong số 5 phân đoạn được dự đoán chức năng này, 3 phân đoạn S7, S9 và S10 đã được nghiên cứu có mức độ bảo thủ cao, tỷ lệ đương đồng đạt trên 80% so với các loài khác trong nhóm 2 của chi *Fijivirus* [9, 13, 15, 16]. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này đã sử dụng đoạn peptide P9.20-39 trên P9 có tính kháng nguyên cao cho thí nghiệm gây miễn dịch nhằm tăng tính đặc hiệu và hiệu giá của kháng thể. Kháng thể thu được có hiệu giá cao hơn rất nhiều so với nghiên cứu trước (1:50.000 so với 1:6.000) và có tính đặc hiệu cao, không phản ứng với RRSV và RGSV. So sánh với kháng thể của Wang và các cộng sự (2012) kháng thể của chúng tôi có hiệu giá thấp hơn; có thể do sự khác nhau về phương pháp xác định hiệu giá (sử dụng kỹ thuật ELISA thay vì Dot-ELISA) [14]. Rất có thể sự có mặt của diệp lục trong mẫu lúa sót lại đã ảnh hưởng đến kết quả ELISA đánh giá hiệu giá kháng thể. Chính vì vậy, trong xét nghiệm chẩn đoán SRBSDV bằng Dot-ELISA, Wang cũng chỉ sử dụng kháng thể với độ pha loãng 1:1.500. Tuy nhiên, tính ổn định, độ đặc hiệu và độ nhạy của kháng thể kháng P9 tạo được vẫn cần phải được phân tích sâu hơn trong các nghiên cứu tiếp theo, với số lượng mẫu đủ lớn để khẳng định hiệu quả của kháng thể trong xét nghiệm SRBSDV. Mặc dù vậy, kết quả nghiên cứu này cũng đã bước đầu cho thấy tiềm năng phát triển bộ kit dạng màng chẩn đoán nhanh SRBSDV dựa trên nguồn kháng thể tự sản xuất ở Việt Nam.

4. KẾT LUẬN

Đã xác định được đoạn peptide P9.20-39 có chiều dài 20 axit amin có tính kháng nguyên cao trên protein P9 của virus gây bệnh LSĐPN. Kháng thể IgG đa dòng kháng P9 đã được tạo ra thành công trên chuột bạch và được tinh sạch bằng sắc kí qua cột Protein A–sepharose. Kháng thể tinh sạch có hiệu giá 1:50.000; nhận biết đặc hiệu virus SRBSDV trong các mẫu lúa nhiễm bệnh lùn sọc đen, lùn xoắn lá, vàng lùn trong xét nghiệm Dot-ELISA. Kết quả nghiên cứu là tiền đề hướng tới phát triển bộ kit dạng

màng chẩn đoán SRBSDV phục vụ kiểm soát dịch bệnh LSĐPN ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Amero S. A., James T. C. and Elgin C. R. (1994). Production of antibodies using protein in gel bands. In: Basic Protein and Peptide Protocols (Humana Press, editor), Springer, 32, pp. 717-720.

2. Báo cáo của Chi cục TT&BVTV Nghệ An, ngày 30/8/2017.

3. GuoH. Z., Jung W. J., Jiang C. D., Peng L., Lin X. D., Guang Z. S. (2008). Southern rice black–streaked dwarf virus: A new proposed Fijivirus species in the family Reoviridae. *Chin. Sci. Bullet.*, 53, pp. 3677-3685.

4. Ha V. C., Nguyen V. H., Vu T. M., Masaru M. (2010). Rice dwarf disease in North Vietnam in 2009 is caused by southern rice black-streaked dwarf virus (SRBSDV). *Bull. Inst. Trop. Agric. Kyushu. Univ.*, pp. 85-92.

5. Hoang A. T., Zhang H. M., Yang J., Chen J. P., Hebrard E., Zhou G. H., Vinh V. N., Cheng J. A. (2011). Identification, characterization, and distribution of southern rice black-streaked dwarf virus in Vietnam. *Plant. Dis.*, 95, pp. 1063–1069.

6. 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, pp. 509-512.

7. Ngô Vĩnh Viễn, Phạm Thị Vượng, Nguyễn Như Cường, Tạ Hoàng Anh, Nguyễn Thị Me, Phan Bích Thu, Phạm Hồng Hiển, Hà Viết Cường và nnk (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, pp.8-18.

8. Đỗ Thị Hạnh, Phạm Thị Vân, Phạm Xuân Hội, 2015. Tạo kháng thể đa dòng kháng vi rút lùn sọc đen Phương Nam hại lúa bằng protein tái tổ hợp. *Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển nông thôn*, số 23.

9. Nguyễn Hoàng Quang, Lại Phương Liên, Đỗ Thị Hạnh, Hà Viết Cường và Phạm Xuân Hội (2014). Nghiên cứu đa dạng di truyền phân đoạn S7 của virus lùn sọc đen Phương Nam ở Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 233(2), pp. 27-32.

10. Nguyễn Hoàng Quang, Phạm Thanh Tâm, Đỗ Thị Hạnh, Phạm Xuân Hội (2014). Phân tích đa dạng di truyền và chức năng phân đoạn S9 của một số chủng vi rút lùn sọc đen phương Nam ở miền Trung và miền Bắc Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 251(2), pp. 3-9.

11. 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), pp. 35-40.

12. Sambrook J. and Russell D. W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

13. Wang Q., Yang J., Zhou G. H., Zhang H. M., Chen J. P., Adams M. J. (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, pp. 733–737.

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

15. Zhang H. M., Yang J., Chen J. P., Adams M. J. (2008). A black-streaked dwarf disease on rice in China is caused by a novel fijivirus. *Arch. Virol.*, 153, pp. 1893–1898.

16. 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 (1), pp. 47-53.

17. Li J, Xue J, Zhang H. M, Yang J, Xie L, Chen J. P. (2015a). Characterization of homologous and heterologous interactions between viroplasm proteins P6 and P9-1 of the *Fijivirus* southern rice

black-streaked dwarf virus. *Arch. Virol.*, 160(2), pp. 453-457.

18. Li X., Zhang W., Ding Y., Wang Z., Wu Z., Yu L., Hu D., Li P., Song B. (2015b). Characterization of the importance of terminal residues for southern rice black-streaked dwarf virus P9-1 viroplasm formations. *Protein Expr. Purif.*, 111, pp. 98-104.

PRODUCTION OF POLYCLONAL ANTIBODY AGAINST PROTEIN P9 OF SOUTHERN RICE BLACK-STRIKED DWARF VIRUS USING SYNTHETIC PEPTIDE ANTIGEN

Nguyen Duy Phuong, Nguyen Anh Minh, Pham Thu Hang, Pham Thi Van, Nguyen Thi Thu Ha, Pham Xuan Hoi, Do Thi Hanh

Summary

Southern rice black-striked dwarf virus (SRBSDV) caused serious rice losses in an area of millions of hectares throughout Southern China, Northern and Central Vietnam in the period 2009-2011. In 2017, the disease showed signs of recurrence in Thai Binh and some rice growing areas in the North. Genome of SRBSDV contains 10 segments of double-stranded RNA named S1 to S10 according to their size from 1.8 to 4.5 kb. While S9 segments is 1899 bp that participates in creating viroplasm structure, plays a role in the process of replication and assembly of virus molecules in host cells. In this study, we produce antibodies against SRBSDV from small antigenic peptide derived from the SRBSDV P9 protein. The purified antibody showed a titer of 1:50.000 and could specifically recognize SRBSDV in SRBSDV-infected rice samples in Dot-ELISA assay.

Keywords: *Rice, SRBSDV disease, polyclonal antibody, P9 protein.*

Người phản biện: GS.TS. Nguyễn Văn Tuất

Ngày nhận bài: 29/7/2021

Ngày thông qua phản biện: 30/8/2021

Ngày duyệt đăng: 6/9/2021