



SẢN XUẤT KHÁNG THỂ ĐA DÒNG KHÁNG KHÁNG NGUYÊN VỎ MIỀN III CỦA VIRUS DENGUE TUÝP 1 Ở CHUỘT NHẮT TRẮNG DÒNG THUẦN BALB/C

Nguyễn Ngọc Lương^{1*}, Phan Thị Minh Phương²

¹ Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế 77 Nguyễn Huệ, Phú Nhuận, Huế, TTH, Việt Nam

² Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế 06 Ngô Quyền, Vinh Ninh, Huế, TTH, Việt Nam

Tóm tắt: Virus dengue là nguyên nhân gây ra bệnh sốt xuất huyết với triệu chứng nặng gồm sốt xuất huyết và sốc sốt xuất huyết. Protein vỏ miền III của virus dengue đã được chứng minh là một trong những epitope có khả năng tạo ra kháng thể trung hòa ở người và đã được tập trung nghiên cứu để phát triển các vaccine tiểu phần cho bệnh sốt xuất huyết. Do đó, kháng thể kháng lại epitope này có tiềm năng ứng dụng trong nghiên cứu, chẩn đoán và nhất là trị liệu cho bệnh nhân mắc bệnh sốt xuất huyết nguy cấp. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày quá trình sản xuất và kiểm tra chất lượng của kháng thể kháng kháng nguyên vỏ miền III của virus dengue tuýp 1 ở chuột nhắt trắng dòng thuần Balb/c. Theo chúng tôi biết, đây là nghiên cứu đầu tiên sử dụng kháng nguyên vỏ miền III của virus dengue tuýp 1 tinh sạch từ *Escherichia coli* để tạo ra kháng thể đa dòng ở chuột nhắt trắng Balb/c tại Việt Nam.

Từ khóa: Protein vỏ miền III, tuýp 1, virus dengue, chuột nhắt trắng, kháng thể đa dòng, hiệu giá kháng thể

1 Đặt vấn đề

Sốt xuất huyết là một bệnh dịch đáng sợ với triệu chứng nặng gồm sốt xuất huyết và sốc sốt xuất huyết có khả năng dẫn đến tử vong. Trên thế giới có trên 70 nước hiện đang nằm trong khu vực có bệnh dịch sốt xuất huyết với số lượng ca mắc bệnh được báo cáo lên tới 500.000 ca mỗi năm và tỉ lệ tử vong có thể lên đến trên 5% ở một số khu vực [6]. Tại Việt Nam, dịch sốt xuất huyết có thể xuất hiện quanh năm nhưng thường đạt đỉnh vào khoảng tháng 6 đến tháng 10 hàng năm. Tỉ lệ ca mắc bệnh có xu hướng gia tăng từ 32,5 ca/100.000 người trong năm 2000 đến 120 ca/100.000 người trong năm 2009 [1]. Trong bốn tuýp virus dengue 1, 2, 3 và 4 thì tuýp 1 và 2 là các chủng chính xuất hiện hàng năm [11]. Theo ước tính, gánh nặng kinh tế do sốt xuất huyết gây nên ở Việt Nam ước tính xấp xỉ 100 triệu USD/năm [9]. Hiện nay, Việt Nam đang là một trong số những nước có chương trình thử nghiệm tiêm chủng loại vaccine sốt xuất huyết nhược độc mới nhất, Dengvaxia (CYD-TVD) [10]. Tuy nhiên, do những phát hiện về nguy cơ mắc bệnh sốt xuất huyết nặng hơn đối với những bệnh nhân tiêm Dengvaxia nhưng chưa từng

* Liên hệ: luongnguyen@husc.edu.vn

bị sốt xuất huyết, Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm đã ra sắc lệnh tuyên bố dừng thử nghiệm Dengvaxia tại Phillipine [7]. Do đó, hiện nay vẫn chưa có một loại vaccine hữu hiệu nào để phòng bệnh sốt xuất huyết trên thế giới. Các phương thức điều trị khác như sử dụng kháng thể đơn dòng không đạt kết quả tốt đối với bệnh sốt xuất huyết do hiện tượng tăng cường độc lực virus thông qua kháng thể không trung hòa (Antibody dependent enhancement, ADE) [5].

Do sự phức tạp trong việc sử dụng virus dengue làm vaccine [7], nỗ lực đang được tập trung để phát triển vaccine tiểu phần. Sau khi cấu trúc của vỏ capsid của virus dengue được giải mã, người ta đã chứng minh được rằng protein vỏ envelope miền III (EDIII) có vai trò quan trọng trong việc giúp virus dengue xâm nhập vào tế bào và cũng là epitope có khả năng tạo ra kháng thể trung hòa [12]. EDIII đã được nghiên cứu rất nhiều trên thế giới nhằm phát triển vaccine tiểu phần [4] cũng như nghiên cứu về các liệu pháp điều trị cho bệnh nhân sốt xuất huyết [5].

Xuất phát từ hình hình nêu trên, chúng tôi nghiên cứu sản xuất kháng thể đa dòng kháng EDIII của virus dengue tuýp 1, một trong những tuýp phổ biến nhất tại Việt Nam, nhằm phục vụ cho nhu cầu nghiên cứu về virus dengue cũng như phát triển các liệu pháp điều trị cho bệnh nhân bị sốt xuất huyết nguy cấp.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Protein EDIII của virus dengue tuýp 1 được biểu hiện ở *Escherichia coli* (*E. coli*) chủng M15 bằng vector biểu hiện pQE30 (Qiagen) và tinh sạch đến trên 95% (không trình bày trong bài báo này). Chuột nhắt trắng Balb/c sáu tuần tuổi (Charles River Laboratories, USA) được dùng để gây miễn dịch và thu nhận kháng huyết thanh.

2.2 Phương pháp

Sản xuất kháng thể đa dòng kháng EDIII từ chuột nhắt trắng

Phương pháp thu nhận kháng huyết thanh đa dòng được thực hiện theo quy trình do Cooper và Paterson đề xuất [8]. Năm con chuột nhắt trắng Balb/c được đánh số từ #1 đến #5 bằng kỹ thuật bấm lỗ tai được thu nhận huyết thanh trước khi tiêm chủng bằng cách lấy máu ở sau hốc mắt. Huyết thanh này được sử dụng để làm đối chứng âm khi kiểm tra tính đặc hiệu kháng nguyên của kháng huyết thanh. Kháng nguyên EDIII được trộn với tá chất Freund complete (Sigma, USA) để nhũ tương hóa bằng cách đẩy kim tiêm chứa 1 mL kháng nguyên EDIII trong đệm PBS và kim tiêm chứa 1 mL tá chất Freund complete qua lại thông qua một giác nối. Sau khi kiểm tra độ nhũ tương hóa của kháng nguyên đã hoàn toàn (bằng cách nhỏ hỗn hợp vào nước sao cho giọt nhũ tương không lan ra trên mặt nước), kháng nguyên được tiêm vào

chuột. Hai ngày sau khi được lấy huyết thanh, chuột được tiêm kháng nguyên vào gân đuôi, dưới da và dưới ổ bụng ; mỗi con chuột được tiêm từ 150 đến 200 μg kháng nguyên. Sau đó cứ cách 2 tuần một lần, chuột được tiếp tục tiêm kháng nguyên đã nhũ tương hóa trong tá chất Freund incomplete vào dưới da (trên lưng) và dưới bụng. Một tuần sau khi tiêm liều lặp ở lần thứ ba, tiến hành thu nhận kháng huyết thanh từ chuột bằng cách lấy máu sau hốc mắt. Kháng huyết thanh được thu nhận bằng cách để máu đông trên 1 giờ ở nhiệt độ phòng sau đó ủ ở 4 °C trong 24 giờ để máu đông hoàn toàn. Dùng tăm gỗ loại bỏ cục máu đông ra khỏi huyết thanh và ly tâm ở 4 °C, tốc độ 13.500 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ tế bào hồng cầu. Kháng huyết thanh được trộn với glycerol 50% theo tỉ lệ 1:1 và bổ sung sodium azide đến 0,02% để bảo quản.

Xác định hiệu giá kháng thể bằng phương pháp miễn dịch hấp phụ (ELISA)

Kỹ thuật tính hiệu giá kháng thể bằng ELISA được tiến hành theo Hackett và cs. [2, 3]. Mỗi thí nghiệm được tiến hành 3 lần và giá trị thu nhận được là giá trị trung bình từ ba lần lặp lại. 100 ng kháng nguyên EDIII tinh khiết được phủ lên đĩa 96 giếng (Nunc MaxiSorp) trong đệm coating chứa 0,015 M Na_2CO_3 và 0,035 M NaHCO_3 qua đêm ở 4 °C. Đĩa được rửa ba lần bằng đệm đệm muối sinh lý (PBS) có bổ sung 0,25% Tween 20 (TPBS) ở bồn rửa và block bằng đệm block chứa 1% albumin huyết thanh bò (BSA) trong PBS với mỗi giếng được bổ sung 200 μL . Sau khi ủ, để block trong 1 giờ ở 37 °C và đĩa được rửa 3 lần bằng đệm TPBS ở bồn rửa. Kháng thể kháng virus dengue thương mại (AbD serotec, USA) được sử dụng làm đối chứng dương và PBS được sử dụng làm đối chứng âm. Kháng thể thương mại, huyết thanh trước khi chủng và kháng huyết thanh được pha loãng vào đệm PBS chứa 0,1% BSA theo tỉ lệ lần lượt là 1:1000, 1:250 và 1:1000. Sau khi bổ sung kháng thể đối chứng dương và đối chứng âm, huyết thanh và kháng huyết thanh của các con chuột số #1 đến #5 vào giếng, chúng được pha loãng hai lần liên tục 8 lần. Đĩa được đem ủ ở 37 °C trong 3 giờ. Sau khi rửa đĩa bằng đệm PBST năm lần, kháng thể thứ hai là kháng thể dê kháng chuột (goat anti-mouse) gắn enzyme alkaline phosphatase (Abcam, USA) được bổ sung vào tất cả các giếng và ủ ở 37 °C trong 2 giờ. Dung dịch hiện màu chứa 10% diethanolamine (thể tích/thể tích), sodium azide 0,02% và 0,5 mM MgCl_2 ở pH 9,8 và 1 viên phosphatase substrate 5 mg (Sigma, USA). Phản ứng được dừng bằng đệm axit phosphoric 1 M và đo ở bước sóng 405 nm.

Độ hấp thụ ở mỗi giếng được tính bằng cách trừ đi độ hấp thụ trung bình của giếng đối chứng âm chứa PBS. Giá trị ngưỡng (cut-off value) cho phản ứng đo hiệu giá kháng thể được tính bằng tỉ lệ pha loãng cao nhất mà độ hấp thụ quang (OD) vẫn cao hơn đối chứng âm (huyết thanh trước khi tiêm kháng nguyên). Hiệu giá kháng thể được tính bằng độ pha loãng cao nhất mà giá trị OD vẫn cao hơn đối chứng âm (trường hợp này là giá trị trung bình của các giếng chứa huyết thanh trước khi gây miễn dịch).

Kiểm tra độ đặc hiệu kháng nguyên của kháng thể bằng kỹ thuật Western blot

Kháng huyết thanh của 5 con chuột được sử dụng làm kháng thể thứ nhất để phát hiện protein EDIII trên màng nitrocellulose. Trước tiên, EDIII tinh khiết được phân giải trên gel SDS-PAGE 15%. Tiếp đến, các protein trên gel được chuyển lên màng nitrocellulose (Amersham, USA). Sau khi block màng bằng đệm block TBST chứa 5% skim milk và 50 mM Tris, 150 mM NaCl và 0,2% Tween 20 (thể tích/thể tích) ở pH 7,5, kháng huyết thanh của 5 con chuột được bổ sung vào khay chứa màng có đánh số theo tỉ lệ 1:2000. Ủ màng với kháng huyết thanh trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Tiếp đến rửa màng ba lần bằng đệm TBST và bổ sung kháng thể hai gắn alkaline phosphatase và ủ trong 2 giờ. Cuối cùng, tiến hành rửa màng ba lần bằng đệm TBST và hiện màu bằng protein đặc hiệu bằng đệm BICP/NBT blue (Surmodics, USA).

Kiểm tra khả năng phản ứng chéo của kháng huyết thanh với các kháng nguyên EDIII của tuýp 3 và 4 bằng kỹ thuật Western blot

Kháng huyết thanh có nồng độ cao nhất được đem kiểm tra khả năng phản ứng chéo với các kháng nguyên EDIII của virus dengue tuýp 3 và 4. Kháng nguyên EDIII của virus tuýp 1, 3 và 4 có độ tinh sạch trên 95% được phân tích trên gel SDS-PAGE 15% và chuyển lên màng cellulose. Quy trình Western blot được tiến hành tương tự như đã mô tả ở phần kiểm tra độ đặc hiệu kháng nguyên.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Kháng huyết thanh và hiệu giá kháng thể

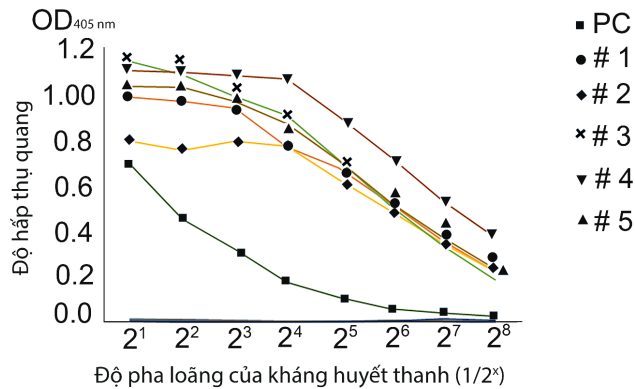
Mỗi con chuột, sau khi thu nhận máu từ chuột gây miễn dịch, cho khoảng 200 μ L kháng huyết thanh. Bổ sung glycerol 50% vào theo tỉ lệ 1:1 cho ra 400 μ L kháng huyết thanh từ mỗi con chuột. Kết quả đo hiệu giá kháng huyết thanh được trình bày ở Hình 1.

Dựa trên kết quả này có thể thấy hầu hết các con chuột đều cho ra kháng huyết thanh có hiệu giá cao. Tất cả các con chuột đều có kháng huyết thanh có hiệu giá cao hơn kháng thể thương mại. Dựa trên Hình 1 có thể ước lượng hiệu giá của kháng thể thương mại vào khoảng 128.000 (1000×2^7), các con chuột số #1, #2, #3 và #5 có kháng huyết thanh có hiệu giá xấp xỉ 256.000 (1000×2^9) và con chuột số #4 có kháng huyết thanh xấp xỉ 512.000 (1000×2^{10}). Tất cả mẫu huyết thanh của chuột chưa miễn dịch đều có giá trị hấp thụ quang bằng 0 sau khi trừ đi độ hấp thụ quang đối chứng âm (giếng không bổ sung kháng thể). Điều này chứng tỏ rằng kháng nguyên tiêm vào chuột đã kích thích sản xuất ra kháng thể đa dòng đặc hiệu.

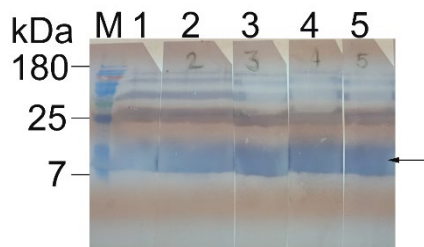
3.2 Kiểm tra độ đặc hiệu của kháng nguyên

Kết quả Western blot (Hình 2) cho thấy tất cả các mẫu kháng huyết thanh thu nhận được đều có tính đặc hiệu với kháng nguyên EDIII có kích thước ~ 14 kDa. Một số băng có kích thước trên 14 kDa xuất hiện, nhưng đây hoàn toàn có thể là tạo tác khi đun nóng (The QIAexpression-

ist, Qiagen manual) EDIII biến tính trong SDS. Điều này thể hiện rõ trên Hình 3 khi cũng có một số băng protein nhạt xuất hiện ở các kích thước xấp xỉ 21 kDa và 28 kDa.



Hình 1. Đồ thị mô tả tỉ lệ pha loãng (trục hoành) và giá trị hấp thụ quang (OD) tại bước sóng 405 nm của các mẫu kháng huyết thanh của con chuột số 1 đến số 5 (được đánh dấu bằng các biểu tượng khác nhau ở cột bên phải) cũng như huyết thanh của các con chuột này trước khi tiêm kháng nguyên (đường xanh đậm ở sát trục hoành). Giá trị biểu diễn ở đồ thị trên là giá trị trung bình của ba lần lặp lại. Trục tung thể hiện độ hấp thụ quang còn trục hoành thể hiện độ pha loãng.

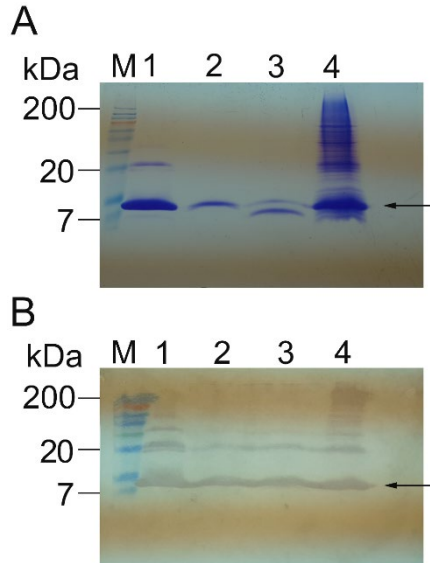


Hình 2. Kết quả Western blot kiểm tra tính đặc hiệu kháng nguyên của các kháng nguyên của chuột số 1 đến số 5. Lượng kháng nguyên ở mỗi hàng ở hình trên ước chừng khoảng 2–3 μg . M: Elpis protein marker, hàng 1, 2, 3, 4 và 5 lần lượt là kết quả kiểm tra tính đặc hiệu kháng nguyên của kháng huyết thanh của chuột số 1 đến số 5.

3.3 Kiểm tra khả năng phản ứng chéo của kháng huyết thanh với EDIII của các chủng dengue tuýp 3 và 4

Một trong những đặc trưng của virus dengue là mức độ khá giống nhau về trình tự axit amin của các protein capsid của các chủng virus kháng nhau. Do đó, thông thường kháng thể kháng một tuýp này có khả năng cũng phản ứng với kháng nguyên của các tuýp khác. Ở đây, chúng tôi tiến hành thử nghiệm khả năng phản ứng chéo của kháng huyết thanh thu nhận được với EDIII của dengue tuýp 3 và 4 do các tuýp này có độ sai khác lớn so với tuýp 1. Kết quả ở Hình 3 cho thấy kháng huyết thanh của con chuột số #4 (có nồng độ cao nhất) có khả năng phản ứng chéo với EDIII của virus dengue tuýp 3 và 4. Dựa trên độ tương tự về trình tự giữa tuýp 1 và 2 (77%), có thể dự đoán kháng nguyên đa dòng thu nhận được cũng sẽ phản ứng với EDIII

của virus dengue tuýp 2. Như vậy, có thể sử dụng kháng thể thu nhận được ở trên cho các nghiên cứu về phát triển vaccine tiểu phân tái tổ hợp hoặc kháng thể đơn dòng trị liệu cho cả bốn loại virus dengue.



Hình 3. Western blot kiểm tra khả năng phản ứng chéo của kháng huyết thanh của chuột số 4 với EDIII của virus dengue tuýp 3 và tuýp 4. 500 ng kháng nguyên EDIII của tuýp 1 và 50 ng kháng nguyên EDIII của tuýp 3 và 4 lần lượt được tải lên các giếng số 1, 2 và 3. Giếng số 4 được tải 2 μ L protein tổng số của dịch phá tế bào *E. coli* biểu hiện kháng nguyên EDIII tuýp 1 (pQE30/M15)

4 Kết luận

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã sản xuất thành công kháng thể đa dòng kháng kháng nguyên vỏ miên III EDIII của virus dengue tuýp 1 từ chuột nhắt trắng Balb/c. Kháng thể đa dòng thu được có hiệu giá cao gấp 2 đến 4 lần so với kháng nguyên thương mại. Kháng thể thu nhận được cũng phản ứng đặc hiệu với EDIII của virus dengue tuýp 1 và đồng thời phản ứng chéo với các EDIII của virus dengue tuýp 3 và 4. Có thể sử dụng kháng thể thu nhận được trong nghiên cứu để phát triển các loại vaccine tiểu phân cho virus dengue hoặc nghiên cứu sản xuất kháng thể đơn dòng trị liệu cho các bệnh nhân mắc bệnh sốt xuất huyết nặng.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện dưới sự tài trợ của Đề tài ĐHH mã số DHH2016-01-87. Tác giả tuyên bố không có mâu thuẫn gì về quyền lợi.

Tài liệu tham khảo

1. <http://www.wpro.who.int/vietnam/topics/dengue/factsheet/en/> accessed on 20th September 2018
2. Hackett D.J., Zhang CP, Stefanescu C., and Pass R.F. (2010). "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Measurement of Cytomegalovirus Glycoprotein B Antibody in Serum". *Clin Vaccine Immunol.* 17(5):836–9.
3. Ludolfs D., Schilling S., Altenschmidt J., and Schmitz H. (2002). "Serological Differentiation of Infections with dengue Virus Serotype 1 to 4 by Using Recombinant Antigens". *J Clin Microbiol.* 40(11):4317–4320.
4. Fahimi H., Mohammadipour M., Haddad K.H., Parvini F., Sadeghizadeh M. (2018). "dengue viruses and promising envelope protein domain III-based vaccines. *Appl Microbiol Biotechnol.* 102(7):2977–2996.
5. Fibriansah G. and Lok S.M. (2016). "The Development of Therapeutic Antibodies against dengue Virus". *Antiviral Res* 128:7–19.
6. Guzman M.G., Halstead S.B., Artsob H., Buchy P., Farrar J., Gubler D.J., Hunsperger E., Kroeger A., Margolis H.S., Martinez E., Nathan M.B., Pelegrino J.L., Simmons C., Yoksan S., Peeling R.W. (2010). "dengue: a continuing global threat". *Nat Rev Microbiol* 8(12 Sup): S7–16.
7. Halstead S.B. (2018). "Safety issues from a Phase 3 clinical trial of a live-attenuated chimeric yellow fever tetravalent dengue vaccine". *Hum Vaccin Immunother.* 26:1–5.
8. Cooper H.M. and Paterson Y. (1995). "Production of Polyclonal Antisera". *Curr Protoc Immunol.* 2.4.1–2.4.9.
9. Hung T.M., Clapham H.E., Bettis A.A., Cuong H.Q., Thwaites G.E., Wills B.A., Boni M.F., Turner H.C. (2018). "The Estimates of the Health and Economic Burden of dengue in Vietnam". *Trends Parasitol.* S1471–4922(18): 30145–4. Doi: 10.1016/j.pt.2018.07.007.
10. Lee J.S., Lourence J., Gupta S., Farlow A. (2018) "A multi-country study of dengue vaccination strategies with Dengvaxia and a future vaccine candidate in three dengue-endemic countries: Vietnam, Thailand, and Columbia". *Vaccine* 36(17): 2346–2355.
11. Thi T.T.D., Martens P., Luu N.H., Wright P. and Choisy M. (2014). "Climatic-driven seasonality of emerging dengue fever in Hanoi, Vietnam". *BMC Public Health* 14:1078.
12. Modis Y., Ogata S., Clements D. and Harrison S.C. (2004). "Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion". *Nature* 427(6972):313–319.

PRODUCTION OF ANTISERA CONTAINING POLYCLONAL ANTIBODIES AGAINST DENGUE ENVELOPE DOMAIN III ANTIGEN IN BALB/C MICE

Nguyễn Ngọc Lương^{1*}, Phan Thị Minh Phương²

¹ College of Sciences, Hue University 77 Nguyen Hue, Phu Nhuan, Hue, TTH, Vietnam

² University of medicine and pharmacy, Hue University, 6 Ngo Quyen, Vinh Ninh, Hue, TTH, Vietnam

Abstract: Dengue viruses are the cause of dengue fever, which can lead to severe syndromes such as dengue Hemorrhage fever and dengue Shock Syndrome. The domain III of the envelope protein of dengue viruses has been proved to be a promising epitope for vaccine development because it induces neutralizing antibodies in human. Therefore, the antibody against these proteins has a great potential for the vaccine development and therapeutic monoclonal antibody development. Herein, we report the first study of its kind in Vietnam for the production of polyclonal antisera against envelope domain III of dengue virus serotype I in Balb/c mice. We also characterized the antibodies for their titers, specificity, and cross-reactivity against dengue 3 and 4.

Keywords: Envelope domain III, serotype I, dengue virus, Balb/c mice, polyclonal antisera, antibody titers