Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Tập 31, Số 3 (2015) 64-71

Sàng lọc một số chủng vi khuẩn và xạ khuẩn có hoạt tính trung hòa virus lở mồm long móng

Nguyễn Quỳnh Uyển[1,*], Phạm Thị Nga[2], Nghiêm Phương Hiền[1], Phan Thị Hà[1], Nguyễn Huỳnh Minh Quyên[1], Dương Văn Hợp[1], Nguyễn Viết Không[2]

[1]*Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Hà Nội, Việt Nam*
[2]*Viện Thú y, 86 Trường Chinh, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 08 tháng 4 năm 2014
Chỉnh sửa ngày 29 tháng 4 năm 2014; Chấp nhận đăng ngày 20 tháng 8 năm 2015

Tóm tắt: Lở mồm long móng là một trong những bệnh gây thiệt hại nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi tại Việt Nam. Để giảm thiệt hại kinh tế, hằng năm nước ta phải tiêu tốn lượng tiền không nhỏ để nhập khẩu vacxin phòng chống bệnh này. Do vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành sàng lọc các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn có hoạt tính trung hòa virus gây bệnh trên dòng tế bào BHK21 nhằm bước đầu chủ động nguồn sinh phẩm phòng chống bệnh trong nước và cung cấp những thông tin về những chủng có hoạt tính quý giá làm tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo. Kết quả bước đầu cho thấy, từ 500 chủng vi khuẩn và xạ khuẩn, 6 chủng có hoạt tính kìm hãm protease (protease inhibitor) đã được chúng tôi sàng lọc. Tuy nhiên, trong số 6 chủng này thì chỉ có 3 chủng (chủng VNA002, B113 và B114) có hoạt tính trung hòa virus lở mồm long móng ở dòng tế bào BHK21. Dựa trên trình tự 16S rDNA, ba chủng này được phân loại là *Streptomyces mirabilis*, *B. thuringiensis* và *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens*

Từ khóa: Lở mồm long móng, trung hòa virus, vi khuẩn, xạ khuẩn.

1. Mở đầu

Bệnh lở mồm long móng (LMLM) là bệnh truyền nhiễm cấp tính ở các loài động vật guốc chẵn như trâu, bò, lợn, dê, cừu và các động vật hoang dã như hươu, nai… Bệnh này rất nguy hiểm, lây lan nhanh và xảy ra trên diện rộng ở một hoặc nhiều nước [1, 2]. Do tính chất lây lan nhanh và ảnh hưởng nghiêm trọng của bệnh, nên tổ chức Bảo vệ sức khoẻ vật nuôi thế giới (OIE) xếp bệnh LMLM vào một trong số những bệnh đứng đầu bảng A (Bảng bệnh truyền nhiễm nguy hiểm của động vật) và bắt buộc các nước thành viên phải khai báo dịch bệnh. Từ 2010, Việt Nam và 5 nước thành viên Đông Nam Á khác đã thống nhất về chương trình phòng chống bệnh LMLM chung cho mỗi Quốc gia và khu vực [theo báo cáo của OIE].

Virus LMLM là một Aphtho virus, thuộc họ *Picornavirideae* và hiện có 7 type là A, O, C, Asia 1, SAT 1, SAT 2 và SAT 3 và hơn 60 subtype [3, 4]. Do tính biến dị cao, có nhiều subtype virus LMLM và subtype mới có thể được tạo ra ngay trong một ổ dịch kéo dài. Tại

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-983265159.
Email: uyennq@vnu.edu.vn

Việt Nam hiện đang lưu hành 3 serotype virus gây bệnh LMLM là O, A, Asia1 [5]. Hàng năm nước ta tiêu tốn khoản kinh phí không nhỏ để nhập vắcxin cho tiêm phòng bệnh này. Theo chương trình Quốc gia về phòng chống bệnh LMLM, mỗi vùng hành chính được nhà nước hỗ trợ tiêm định kỳ với loại vắcxin phù hợp type theo khuyến cáo của Cục thú y. Tuy nhiên, tại những khu vực gia súc đã tiêm phòng, đôi khi dịch LMLM vẫn xảy ra như ở tỉnh Ninh Thuận năm 1997, tỉnh Bắc Cạn năm 1999; Hà Tĩnh, Quảng Trị, Thanh Hóa, Nghệ An và Quảng Nam năm 2013. Gần đây, bệnh xảy ra phổ biến trên lợn với đặc điểm gây chết nhiều lợn con và lợn choai, đối tượng chưa được tiêm phòng, gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng. Trong tình hình chưa chủ động được nguồn vắcxin và có nhiều type virus lưu hành tại thực địa, việc tìm kiếm nguồn chế phẩm sinh học như chất kháng virus và các các giải pháp phòng trị bệnh phụ trợ là nhu cầu cấp thiết.

Vi sinh vật được biết là nguồn sinh các chất có hoạt tính sinh học quý giá với các ứng dụng quan trọng. Trong chiến lược chống virus, chất ức chế protease (Protease Inhibitor, PI) đã được sử dụng để ức chế protease của virus. Cụ thể là PI đã được sử dụng làm thuốc chống sao chép của virus HIV, virus viêm gan C [6-10]. Đối với virus LMLM, 3C-protease cũng là enzyme đích cho một số sinh phẩm [11]. Để chủ động nguồn sinh phẩm phòng chống bệnh và phát huy tác dụng của chương trình bảo tồn quỹ gene, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành sàng lọc các chất ức chế protease từ 500 chủng xạ khuẩn và vi khuẩn được lưu giữ tại Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội. Kết quả là, chúng tôi đã sàng lọc được 6 chủng có hoạt tính PI và trong số đó 3 chủng (chủng VNA002, B113 và B114) có hoạt tính trung hòa virus LMLM trên dòng tế bào nuôi cấy BHK21. Sau đó, dựa trên trình tự 16S rDNA, ba chủng vi sinh vật có hoạt tính sinh học đặc biệt này được phân loại là *Streptomyces mirabilis* (có 99,72% tương đồng với *Streptomyces mirabilis* NBRC 13450), *Bacillus thuringiensis* (có 99,93% tương đồng với *B. thuringiensis* ATCC 10792) và *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* (có 99,72% tương đồng với *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* DSM 7).

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn, môi trường LB và môi trường YS4, tế bào BHK-21 (Baby Hamster Kidney line 21), chủng virus LMLM Vit4-VP02, MEM, FBS, trypsin, kháng sinh, kháng nấm, PBS, formol, methylene blue, amido black 10B, acetic acid.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Nuôi cấy vi khuẩn và xạ khuẩn

Các chủng vi sinh vật được cấy ria trên đĩa chứa môi trường thích hợp (môi trường LB cho vi khuẩn và môi trường YS4 cho xạ khuẩn). Các khuẩn lạc đơn được nuôi cấy trong môi trường lỏng tương ứng để lấy dịch trong xác định hoạt tính.

2.2.2. Hoạt tính ức chế protease

0,1% cơ chất tương ứng và 1,8% thạch được bổ sung vào đệm có nồng độ và pH thích hợp cho từng loại protease. Đun hỗn hợp này cho tới khi cơ chất và thạch tan hoàn toàn, sau đó hỗn hợp được đổ vào đĩa petri với độ dày 0,5 cm. Đục các giếng có đường kính bằng nhau trên đĩa thạch vừa đổ. Dịch mẫu cần nghiên cứu được trộn với enzyme tương ứng. 25 µl các hỗn hợp này được nhỏ vào mỗi giếng thạch. Đĩa được ủ ở 37˚C trong vòng 12 – 24 giờ và sau đó

được nhuộm bằng amido black 10B 0,1% trong dung dịch acetic acid 7%. Đường kính vòng phân giải phản ánh hoạt tính PI của dịch nuôi vi sinh vật.

2.2.3. Phương pháp nuôi cấy tế bào BHK-21

Phương pháp nuôi cấy tế bào BHK-21 được thực hiện theo quy trình thường quy và tóm tắt như sau: Tế bào BHK-21 nuôi trong chai T75 trong 2-3 ngày bám đáy 90-100%. Sử dụng trypsin-EDTA tách tế bào. Trung hòa trypsin bằng MEM 10% FBS. Li tâm tế bào 700 vòng trong 10 phút. Thu cặn tế bào. Pha loãng tế bào về mật độ 10^6 tế bào/ml môi trường MEM 10% FBS.

2.2.4. Phương pháp chuẩn độ virus (TCID50)

Phương pháp chuẩn độ virus (TCID50) được thực hiện theo quy trình thường quy và tóm tắt như sau: Virus LMLM Vit4-VP02 được pha loãng từ nồng độ 10^{-1} -10^{-8}. Cho 100 µl virus đã pha loãng ở các nồng độ khác nhau (ít nhất 5 giếng một nồng độ) vào đĩa 96 giếng. Thêm 100 µl huyễn dịch tế bào (mật độ $5x10^5$ tế bào/ml) vào mỗi giếng. Nuôi và theo dõi CPE (cytopathic effect) trong 3 ngày ở tủ ấm 37^0C 5% CO_2. TCID50 của virus sẽ được tính theo công thức của Spearman-Kaber hoặc Read Muench.

2.2.5. Phương pháp trung hòa virus LMLM trên tế bào BHK-21

Phương pháp này được thực hiện theo quy trình thường quy và tóm tắt như sau: Mẫu sau khi cô đặc bằng máy đông khô được hoàn nguyên trong MEM, lọc qua màng 0,45 µm. Pha loãng 50 µl mẫu này theo hệ số 2 trong MEM trên đĩa 96 giếng. Thêm 50 µl virus LMLM có 100TCID50. Ủ 37^0C trong 1 giờ. Thêm 50 µl huyễn dịch tế bào (mật độ 10^6 tế bào/ml). Nuôi ở 37^0C 5% CO_2 trong 3 ngày. Sau 3 ngày cố định tế bào bằng 10% formol trung tính và nhuộm tế bào bằng methylene blue 0,05%. Kết quả được đọc dựa trên mật độ tế bào nhuộm theo hướng dẫn của OIE. Kết quả dương tính là tế bào ở giếng phản ứng không bị phá huỷ, các tế bào bắt màu xanh của thuốc nhuộm. Kết quả âm tính quan sát thấy khi tế bào bị phá huỷ bong khỏi đáy giếng, để lại khoảng trống.

2.2.6. PCR 16S rDNA và sơ đồ phả hệ

Gene 16S rRNA của các chủng vi sinh vật được khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu bảo thủ cho gene này (27F: AGAGTTTGATCCTGGC TCAG và 1492R: GGTTACCTTGTTACGAC TT). Hỗn hợp phản ứng (50 µl) gồm 5 µl hỗn hợp đệm (0,2 M Tris- HCl pH 8,3; 0,25 M KCl, 20 mM $MgCl_2$), 20 nM mỗi loại deoxynucleotide, 50 pM mỗi loại mồi; 2,5 U Taq DNA polymerase và 1 µl DNA khuôn. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR: biến tính ở 95ºC trong 5 phút, tiếp theo là 30 chu kỳ (95ºC: 30 giây, 52ºC: 30 giây và 72ºC: 1 phút) và 72ºC: 7 phút. Sản phẩm PCR sau đó được phân tích bằng điện di trên gel agarose và được gửi đến hãng Macrogen (Hàn Quốc) để xác định trình tự.

Trình tự 16S rDNA được so sánh với trình tự đã có trên dữ liệu GenBank bằng việc sử dụng công cụ BLAST. Sau đó các trình tự này được sắp xếp tương ứng bằng cách sử dụng chương trình CLUSTAL_X phiên bản 1.8 [12]. Cây phân loại được tạo nên bằng phương pháp neighbor- joining [13] sử dụng phép toán Tamura-Nei với độ lặp lại 1.000 lần trên phần mềm MEGA phiên bản 5.05 [14].

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả sàng lọc các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn có hoạt tính ức chế protease

Các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn được hoạt hóa, nuôi cấy và ly tâm lấy dịch trong xác định

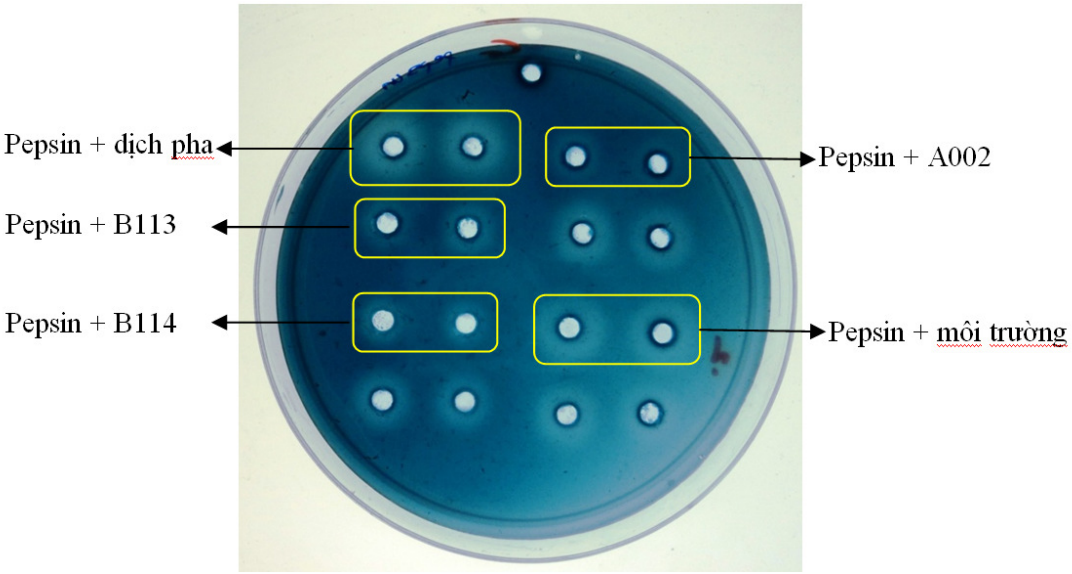
hoạt tính ức chế các protease đại diện cho 3 nhóm (trypsin, papain và pepsin). Do không có protease kim loại nên chúng tôi đã không tiến hành sàng lọc được các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn có hoạt tính ức chế enzyme thuộc nhóm này. Theo tài liệu đã công bố thì virus LMLM có 2 loại protease: một loại (protease 2A và 3C) thuộc họ tương tự serine protease và một loại (L protease) liên quan đến họ papain [15]. Tuy nhiên, trong số 500 dịch chiết vi khuẩn và xạ khuẩn chúng tôi không sàng lọc được bất kỳ chủng nào có hoạt tính ức chế trypsin, papain mà chỉ thu được 3 chủng xạ khuẩn và 3 chủng vi khuẩn có hoạt tính ức chế pepsin. Kết quả sàng lọc các chủng xạ khuẩn và vi khuẩn có hoạt tính ức chế pepsin được thể hiện trong hình 1.

Để xác định hoạt tính kháng virus LMLM, chúng tôi đã thử các dịch chiết vi khuẩn bằng phương pháp trung hòa virus trên tế bào nuôi cấy BKH21.

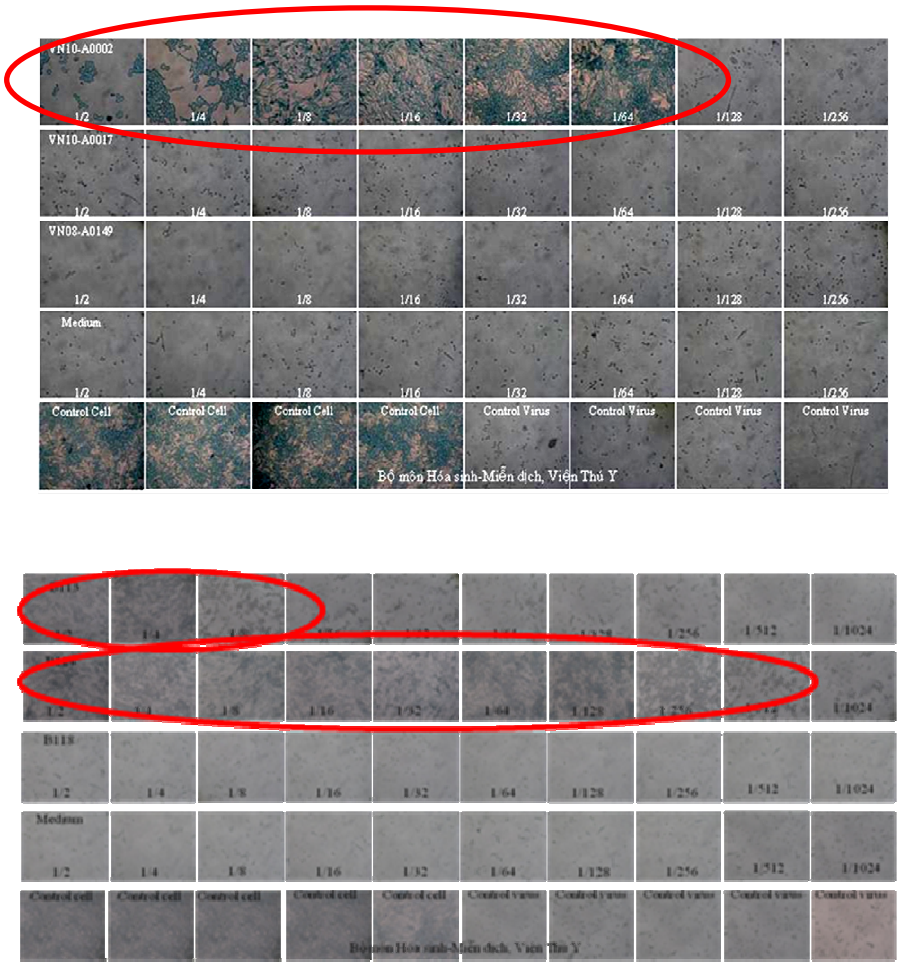
3.2. Kết quả sàng lọc các chủng xạ khuẩn và vi khuẩn có hoạt tính trung hòa virus LMLM

Dựa trên chiến lược tiêu diệt virus (sử dụng chất ức chế protease) đã được ứng dụng trong những năm gần đây [16-19] với hy vọng là bước đầu sẽ sàng lọc được chủng có hoạt tính ức chế virus LMLM, chúng tôi đã sử dụng dịch nuôi cấy các chủng vi sinh vật này để thử hoạt tính trung hòa virus LMLM ở tế bào BHK-21.

Kết quả trung hòa virus LMLM của dịch nuôi cấy vi khuẩn và xạ khuẩn được thể hiện trong hình 2.



Hình 1. Các chủng có hoạt tính ức chế pepsin.

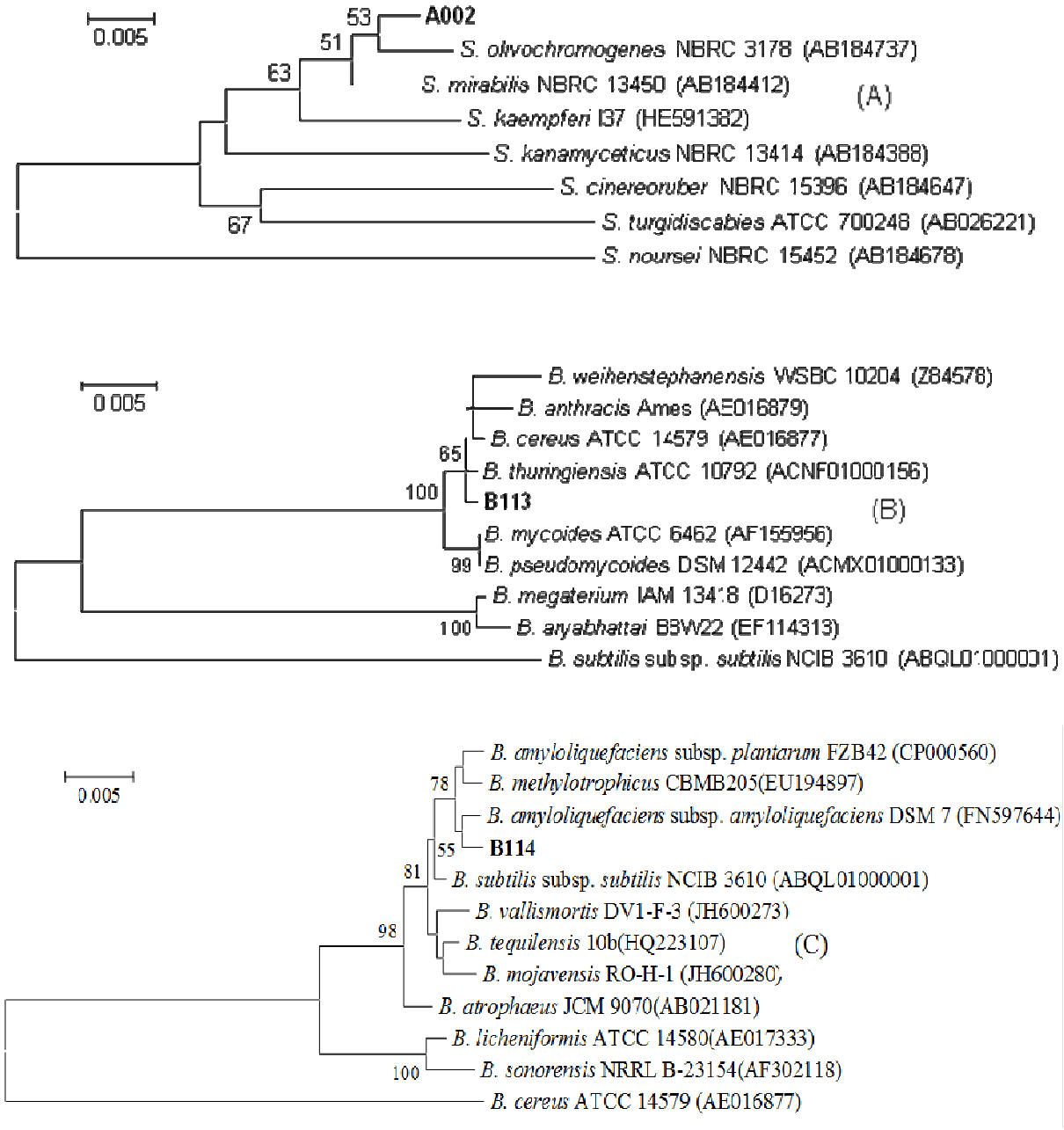


Hình 2. Hoạt tính trung hòa virus LMLM ở tế bào BHK-21.

Kết quả hình 2 cho thấy: trong số 6 chủng vi khuẩn và xạ khuẩn có hoạt tính ức chế protease thì chỉ có 1 chủng xạ khuẩn (A002) và 2 chủng vi khuẩn (B113 và 114) là có hoạt tính trung hòa virus LMLM. Ở độ pha loãng lần lượt là 1/64, 1/8 và 1/512 dịch nuôi cấy các chủng A002, B113 và B114 thể hiện hoạt tính trung hòa virus LMLM trên tế bào BHK-21. Tuy nhiên đây mới chỉ là kết quả bước đầu sàng lọc sơ bộ, chúng tôi cần tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về bản chất của việc ức chế virus này.

3.3. Kết quả phân loại chủng vi khuẩn và xạ khuẩn có hoạt tính trung hòa virus LMLM

Ba chủng vi khuẩn và xạ khuẩn có hoạt tính trung hòa virus LMLM được chúng tôi phân loại đến loài dựa trên trình tự 16S rDNA. Kết quả cho thấy là chủng A002, B113 và B114 lần lượt được phân loại là chủng *Streptomyces mirabilis* (có 99,72% tương đồng với *Streptomyces mirabilis* NBRC 13450), chủng *B. thuringiensis* (có 99,93% tương đồng với *B. thuringiensis* ATCC 10792) và chủng *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* (có 99,72% tương đồng với *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* DSM 7). Kết quả này được thể hiện ở hình 3.



Hình 3. Cây phân loại của các chủng A002 (A), B113 (B) và B114 (C).

Tuy nhiên, qua tham khảo những công trình đã công bố thì ba chủng trên (*S. mirabilis, B. thuringiensis* và chủng *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens)* không có chủng nào có khả năng sinh tổng hợp chất chống virus. Chính vì vậy, kết quả ban đầu này rất đáng quan tâm để chúng tôi tiến hành các nghiên cứu tiếp sâu hơn.

5. Kết luận

Từ 500 chủng vi khuẩn và xạ khuẩn, 6 chủng có hoạt tính ức chế protease đã được sàng lọc.

Trong số 6 chủng thể hiện hoạt tính protease inhibitor thì 3 chủng (chủng VNA002, B113 và B114) có hoạt tính trung hòa virus LMLM ở dòng tế bào BHK21.

Dựa trên trình tự 16S rDNA, ba chủng này được phân loại là *Streptomyces mirabilis*, *Bacillus thuringiensis* và *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens*.

Lời cảm ơn

Công trình này đã được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ nhiệm vụ: "Đánh giá tiềm năng di truyền một số nguồn gene vi khuẩn và xạ khuẩn của Việt Nam", mã số NVQG-2011/25 do TS. Nguyễn Quỳnh Uyển chủ trì.

Tài liệu tham khảo

[1] Văn Đăng Kỳ, Nguyễn Văn Thông. Một số kết quả phòng chống bệnh lở mồm long móng trên thế giới. Tạp chí Khoa Học Kỹ Thuật Thú Y **7,** 83-88, 2000.

[2] Cục Thú y. Sổ tay phòng chống bệnh lở mồm long móng. Nhà Xuất Bản Nông Nghiệp 1-90, 2003.

[3] Carrillo C., Tulman E. R., Delhon G. Comparative genomics of Foot-and-Mouth disease virus. Journal of virology **79,** 6487-6504, 2005.

[4] Cheung A, DeLamarter J, Weiss S, Kupper H. Comparison of the major antigenic determinants of different serotypes of foot-and-mouth disease virus. Journal of virology **48,** 451-459, 1983.

[5] Tô Long Thành, Bùi Quang Anh, Hoàng Văn Năm. Kết quả chẩn đoán bệnh, giám sát sự lưu hành của virus và sự lựa chọn vắc xin phòng chống bệnh LMLM của Cục thú y (1985- 2006). Tạp chí Khoa Học Kỹ Thuật Thú Y 13, 71-75, 2006.

[6] Berke Martin Jan, et all (2011), Antiviral Activity and Mode of Action of TMC647078, a Novel Nucleoside Inhibitor of the Hepatitis C Virus NS5B Polymerase, Antimicrobial agents and chemotherapy, p. 3812–3820.

[7] Binder Joseph, et all (2011), Development of hepatitis C virus chimeric replicons for identifying broad spectrum NS3 protease inhibitors, Antivial Research 91, p. 102 – 111.

[8] Federico Maurizio, et all (2011), HIV-protease inhibitors block the replication of both vesicular stomatitis and influenza viruses at an early post-entry replication step, Virology 417, p. 37 – 49.

[9] Gantt Soren, et all (2011), The HIV Protease Inhibitor Nelfinavir Inhibits Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Replication In Vitro, Antimicrobial agents and chemotherapy, p. 2696 – 2703.

[10] Kazuhiko. I, et all (2011), Novel HIV-1 protease inhibitors (PIs) containing a bicyclic P2 functional moiety, tetrahydropyrano-tetrahydrofuran, that are potent against multi-PI-resistant HIV-1 variants, Antimicrob. Agents Chemother, doi:10.1128/AAC.01540-10.

[11] Curry S., et al., (2007), Foot-and-mouth disease virus 3C protease: recent structural and functional insights into an antiviral target. Int. J. Biochem. Cell Biol. 39:1–6

[12] Thomson CJ et al. (1995) Gentics and biochemistry of antibiotic production. Butterworth- Heinemann, Boston, London, Oxford, Singapore, Syndey, Toronto, Wellington: 197- 222.

[13] Saitou N, Nei M (1987) The neighbor - joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Bilo Evol **4**: 406- 425

[14] Felsen Stein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution **39**: 783- 791.

[15] Kleina G. Lynn, et all (1992), Antiviral Effects of a Thiol Protease Inhibitor on Foot-and-Mouth Diease Virus, Journal of Virology, p.7168 – 7175.

[16] Lim Annie Huichang, et all (2011), Novel agmatine and agmatine-like peptidomimetic inhibitors of the West Nile virus NS2B/NS3 serine protease, European Journal of Medicinal Chemistry 46, p. 3130 – 3134.

[17] Lu Jian-Ming, et all (2012), Ginkgolic acid inhibits HIV protease activity and HIV infection in vitro, Basic Research, 18(8): BR293-298.

[18] Pasquato Antonella, et all (2012), Evaluation of the anti-arenaviral activity of the subtilisin kexin isozyme-1/site-1 protease inhibitor PF-429242, Virology 423, p. 14 – 22.

[19] Tomlinson M. Suzanne, et all (2011), Anthracene – based inhibitors of dengue virus NS2B – NS3 protease, Antivial Research 89, p.127 – 135.

Screening some Bacterial and Actinomycete Strains Owning Properties to Neutralise Foot and Mouth Disease Virus

Nguyễn Quỳnh Uyển[1], Phạm Thị Nga[2], Nghiêm Phương Hiền[1], Phan Thị Hà[1], Nguyễn Huỳnh Minh Quyên[1], Dương Văn Hợp[1], Nguyễn Viết Không[2]

[1]*Institute of Microbiology and Biotechnology, Vietnam National University, 144 Xuân Thủy, Hanoi, Vietnam*

[2]*National Institute of Veterinary Research, 86 Trường Chinh, Hanoi, Vietnam*

Abstract: Foot and mouth disease is a one of severe diseases that damage strongly husbandry in Vietnam. Currently, Vietnam has to import the vaccine against this disease. Therefore in our study we screened bacteria and actinomycetes capable of neutralising foot and mouth viruses in the cell line BHK21 in order to produce our product against this desease as well as to provide basic information for further study. As the preliminary results, from 500 bacterial and actinomycete strains, 6 strains with protease inhibitor activity were selected. However, among them just 3 strains (VNA002, B113 và B114) showed neutralising activity to foot and mouth viruses in the cell line BHK21. Based on the sequence of 16S rDNA, these strains were classified as *Streptomyces mirabilis*, *B. thuringiensis* and *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens.*