CLONE AND SEQUENCE COMPLETE E2 GENE OF CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS FROM SEVERAL FARMS IN THE SOUTH VIETNAM

Nguyen Minh Nam[1,2], Nguyen Thi Phuong Binh[3], Lai Cong Danh[3], Nguyen Ngoc Hai[3*]
[1]Vietnam National University Ho Chi Minh City, [2]P&Y Livestock Service Company Limited, Ho Chi Minh City
[3]Nong Lam University, Ho Chi Minh City

ARTICLE INFO

Received: 09/6/2022
Revised: 29/7/2022
Published: 31/7/2022

KEYWORDS

CSFV
Gene E2
Sequencing
Cloning
Classical swine fever

ABSTRACT

Classical swine fever is an old and dangerous disease that causes significant economic losses to the swine industry worldwide. *E2* protein-coding gene sequencing is an essential basis for assessing and comparing the genetic diversity of CSFV and developing a vaccine against CSFV. This study was conducted to create *E. coli* cells carrying plasmids containing the full-length *E2* gene sequences. Twenty-one CSFV-positive samples were collected that were transformed into *E. coli* DH5α cells. The plasmids were then purified and sequenced to evaluate the effectiveness of the cloning method. The results showed that the research has successfully created 21 strains of E. coli bacteria carrying the complete *E2* gene. These sequences were highly similar (87.94 – 98.84%) compared with the 100 sequences having the highest similarity on NCBI. Besides, 19 sequences had very high similarity with strains belonging to subgroup 2.1c (95.00 - 96.34%) and two sequences with subgroup 2.2 (92.05 - 93.03%). This study is the basis for applying the E. coli cloning technique carrying the *E2* gene in stable genetic analysis of CSFV, as well as the basis for the subsequent generation of recombinant *E2* proteins for developing an *E2*-subunit vaccine against CSFV.

TẠO DÒNG VÀ GIẢI TRÌNH TỰ TOÀN BỘ GENE *E2* CỦA VIRUS DỊCH TẢ HEO CỔ ĐIỂN Ở MỘT SỐ TRẠI HEO TẠI MIỀN NAM VIỆT NAM

Nguyễn Minh Nam[1], Nguyễn Thị Phương Bình[2], Lại Công Danh[3], Nguyễn Ngọc Hải[3*]
[1]Trường Đại học Quốc gia Tp.HCM, [2]Công Ty TNHH Dịch vụ chăn nuôi P&Y , Tp. HCM, Việt Nam
[3]Trường Đại học Nông Lâm, Tp. HCM

THÔNG TIN BÀI BÁO

Ngày nhận bài: 09/6/2022
Ngày hoàn thiện: 29/7/2022
Ngày đăng: 31/7/2022

TỪ KHÓA

CSFV
Gene E2
Giải trình tự
Tạo dòng
Dịch tả heo cổ điển

TÓM TẮT

Bệnh dịch tả heo cổ điển (Classical swine fever disease) là một bệnh lâu đời, nguy hiểm và gây thiệt hại kinh tế đáng kể cho ngành chăn nuôi heo trên toàn thế giới. Trình tự gene mã hóa protein *E2* là một cơ sở quan trọng để đánh giá, so sánh đa dạng di truyền của CSFV và phát triển vaccine. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm tạo ra các dòng *E. coli* mang plasmid chứa đầy đủ trình tự gene *E2*. 21 mẫu dương tính với CSFV đã được thu thập được biến nạp vào các dòng *E. coli* DH5α. Các plasmid sau đó được tinh sạch và giải trình tự nhằm đánh giá hiệu quả của phương pháp tạo dòng. Kết quả cho thấy nghiên cứu đã tạo thành công 21 dòng vi khuẩn *E. coli* mang toàn bộ gene *E2* của CSFV. Các trình tự này tương đồng cao (87,94 – 98,84%) khi so sánh với 100 trình tự có độ tương đồng cao nhất trên NCBI. Ngoài ra, 19 trình tự tương đồng rất cao với các chủng thuộc phân nhóm 2.1c (95,00 – 96,34%) và 2 trình tự với phân nhóm 2.2 (92,05 – 93,03%). Nghiên cứu này là cơ sở cho việc áp dụng kĩ thuật tạo dòng *E. coli* mang gene *E2* trong việc phân tích di truyền của CSFV một cách ổn định, cũng là cơ sở cho sự tạo ra các protein *E2* tái tổ hợp phục vụ việc phát triển vaccine tiểu đơn vị chống CSFV sau này.

DOI: https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6139

* Corresponding author. *Email: nguyenngochai@hcmuaf.edu.vn*

1. Giới thiệu

Virus dịch tả heo cổ điển (Classical swine fever virus - CSFV) gây bệnh dịch tả heo (Classical swine fever disease - CSF), một bệnh truyền nhiễm nguy hiểm và gây thiệt hại kinh tế đáng kể cho ngành chăn nuôi heo ở các nước trên thế giới, trong đó có Việt Nam. Dựa trên gene *E2* và một phần *NS5B*, các chủng CSFV ban đầu được phân loại thành hai kiểu gene và năm kiểu gene phụ [1]. Đến nay, CSFV đã được chia thành ba nhóm di truyền (genotype) với ba hoặc bốn phân nhóm trong cùng một nhóm (1.1, 1.2, 1.3; 2.1, 2.2, 2.3 và 3.1, 3.2, 3.3, 3.4) [2]. Kiểu gene phụ 2.1 đã được chia thành các nhóm 2.1a và 2.1b [3], [4]. Theo Gong (2016) các chủng CSFV kiểu gene 2.1 hiện tại trên thế giới có thể được chia thành 10 kiểu gene phụ (2.1a - 2.1j) [5]. Theo nghiên cứu của Kamakawa và cộng sự (2006), các chủng CSFV được phân lập ở Việt Nam từ năm 1999 đến năm 2000 phần lớn thuộc phân nhóm 2.1 và 2.2 [6]. Nghiên cứu này cũng ghi nhận đa phần các chủng CSFV phân lập ở khu vực đồng bằng sông Cửu Long trong năm 2016 nằm trong phân nhóm 2.1 và còn lại trong phân nhóm 2.2. Tuy nhiên, những nghiên cứu này chỉ đánh giá trên một phần trình tự của gene *E2*. Thực tế hiện nay trên thế giới đang ngày càng có nhiều nghiên cứu dựa trên trình tự đầy đủ của gene *E2* (1119 nucleotide) của CSFV, nhằm phân tích đầy đủ hơn về các chủng đột biến, các yếu tố quyết định độc lực, cũng như phân tích đầy đủ hơn về dịch tễ học phân tử của CSFV [7], [8] và được chứng minh là đáng tin cậy trong các phân tích phát sinh loài [9], [10].

Bên cạnh đó, protein E2 có 373 amino acid, 51-55 kDa, là glycoprotein vỏ chính và là kháng nguyên đặc trưng của CSFV và có tính sinh miễn dịch cao nhất trong số các protein của virus. Hầu hết các kháng thể trung hoà được sinh ra trong đáp ứng miễn dịch của cơ thể vật chủ đối với CSFV đều nhằm vào glycoprotein này. Ngoài ra, *E2* còn là một yếu tố quyết định độc lực (virulence determinant) của virus [11]. Chẩn đoán huyết thanh học CSFV chủ yếu dựa trên việc phát hiện các kháng thể đặc hiệu với *E2* [12]. Hơn nữa, protein này còn có thể tạo ra tính sinh miễn dịch bảo hộ [13]. Do đó, sự biến đổi của gene này có thể dẫn đến sự thay đổi về đặc điểm kháng nguyên của virus và có thể tác động đến khả năng tạo kháng thể trung hòa hình thành miễn dịch bảo hộ, ảnh hưởng đến hiệu quả của vaccine.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật tạo dòng vi khuẩn *E. coli* mang các trình tự gene *E2* của CSFV. Về cơ bản, kỹ thuật này được thực hiện qua 3 giai đoạn chính: Xác định đoạn gene (hoặc DNA) cần thiết và lựa chọn yếu tố mang thích hợp; nhân đoạn gene thích hợp với số lượng lớn để đưa vào yếu tố mang; thu nhận dòng tái tổ hợp và kiểm tra chất lượng dòng thu được [14]. Các trình tự sau khi được biến nạp thành công sẽ được giải trình tự nhằm đánh giá tính hiệu quả của phương pháp tạo dòng. Nghiên cứu này sẽ là nền tảng cho việc phân tích di truyền của CSFV, đồng thời là nền móng cho cho các nghiên cứu chuyên sâu về protein *E2* của các chủng CSFV thực địa.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Khảo sát hiệu quả của kỹ thuật tạo dòng gene *E2* vào vector pGEM-T Easy.
- Xác định sự phân bố về kiểu gene của các chủng CSFV thực địa dựa trên gene *E2* ở các vùng khác nhau tại Việt Nam.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

- Mẫu bệnh phẩm: Tổng số 21 mẫu RNA của CSFV được thu thập từ mẫu xét nghiệm có kết quả dương tính của một số trại heo có biểu hiện bệnh CSF ở các tỉnh Đồng Nai, Lâm Đồng, Tây Ninh, Vũng Tàu, Khánh Hoà, Long An, Tiền Giang, Bình Dương và thành phố Hồ Chí Minh.

- Thiết bị: Máy ly tâm lạnh, nồi hấp khử trùng, máy lắc ủ nhiệt, bồn điện di, máy PCR, máy vortex, bồn nước ủ nhiệt, lò vi sóng, tủ âm, tủ lạnh và tủ an toàn sinh học cấp 2.

- Môi trường và hóa chất: Môi trường LB (Luria Bertani); Môi trường thạch Agar LB bổ sung ampicillin, IPTG và X-gal với lượng lần lượt là 1 µl/ml, 5 µl/ml và 2 µl/ml; Môi trường SOC.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Khuếch đại và phân lập gene E2 của CSFV bằng kỹ thuật RT – PCR và điện di

Huyết thanh và mô của tất cả 21 mẫu bệnh phẩm dương tính với CSFV tại Phòng chẩn đoán xét nghiệm thú y Việt – Hàn được thu thập và ly trích RNA bằng kit GeneJET Viral DNA/ RNA Purification Kit (Thermo, Mỹ). Sợi cDNA được tổng hợp bằng bộ kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo, Mỹ). Gene *E2* trong mẫu được khuếch đại bằng phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu (Bảng 1). Thành phần từng phản ứng PCR gồm: 12,5 µl GoTaq G2 Green Master Mix; 1,0 µl mỗi mồi (nồng độ cuối là 0,4 µM); 5 µl DNA mẫu và thêm nước Nuclease free water để đạt tổng thể tích 25 µl cho mỗi phản ứng. Chu trình luân nhiệt bao gồm: 1 chu kỳ 95°C, 5 phút; 35 chu kỳ 95°C trong 30 giây, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 75 giây; và kết thúc tại 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose với nồng độ 1% và đọc kết quả trên buồng chiếu tia UV. Tinh sạch DNA từ gel sau khi điện di bằng bộ kit GenJET Gel Extraction and DNA Micro Kit (Thermo, Mỹ).

Bảng 1. *Trình tự cặp mồi được sử dụng cho phản ứng RT - PCR gene E2*

Tên mồi	Trình tự (5’ - 3’)	Kích thước
CSF - E2F	AATTGGATCCCGGTTGTCCTGTAAGGAAG	1141 bp
CSF - E2R	TTATGAATTCTTAACCGGCAGCAAGTTGCTC	

2.3.2. Tạo dòng gene E2 vào vector pGEM - T Easy

Phản ứng nối gene *E2* vào vetor pGEM - T Easy

Tổng thể tích của phản ứng là 10 µl được trộn đều và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ hoặc ủ qua đêm ở 4ºC. Thành phần phản ứng gồm: 5 µl Rapid Ligation Buffer 1X, 1 µl Vector pGEM - T Easy (5 ng/µl), 2 µl sản phẩm PCR tinh sạch, 1 µl T4 DNA ligase (0,3 U/µl), và 1 µl nuclease - free water.

Chuẩn bị tế bào *E. coli* DH5α khả nạp

Tế bào *E. coli* DH5α được tạo khả nạp bằng phương pháp $CaCl_2$. Sau khi nuôi cấy lắc trong môi trường LB lỏng khoảng 3 - 4 giờ ở 37ºC (lắc 150 vòng/phút), bình tam giác chứa vi khuẩn được chuyển vào thùng đá giữ lạnh trong 30 phút. Hút 1,5 ml dịch nuôi cấy cho vào eppendorf 1,5 ml, ly tâm 4000 vòng trong 10 phút ở 4ºC và thu phần sinh khối kết tủa bên dưới (lặp lại thêm 2 lần). Sau đó, cho 1 ml $CaCl_2$ 100 mM lạnh vào eppendorf và trộn nhẹ để hoà tan phần sinh khối trên. Tiếp tục ly tâm 4000 vòng trong 10 phút ở 4ºC, đổ bỏ phần dịch bên trên, tiếp đến cho 100 µl dung dịch (85% $CaCl_2$ 100 mM, 15% glycerol) lạnh vào hoà tan phần sinh khối trên và lưu trữ ở -70ºC đến khi sử dụng.

Biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào *E. coli* DH5α khả nạp

Vector tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5α bằng kỹ thuật sốc nhiệt. Hút 10 µl mỗi phản ứng nối cho vào 100 µl tế bào khả nạp và búng nhẹ tube vài lần. Giữ tube trên đá trong 10 phút, sau đó sốc nhiệt tế bào trong 45 - 50 giây trong bồn nước ở 42ºC, tiếp đến lập tức chuyển tube vào trong đá trong 2 phút. Thêm 900 µl môi trường SOC lạnh vào mỗi phản ứng biến nạp và ủ trong 1,5 giờ ở 37ºC (lắc 150 vòng/phút). Sau đó ly tâm các tube thu cặn ở 4000 vòng trong 10 phút. Hoà cặn trong 200 µl môi trường SOC và trải 100 µl lên mỗi đĩa LB/ampicillin/IPTG/X-Gal. Ủ các đĩa qua đêm ở 37ºC (16 - 24 giờ).

Chọn lọc dòng tế bào mang vector tái tổ hợp

Sau khi ủ các đĩa qua đêm ở 37ºC, trên bề mặt môi trường sẽ hình thành các khuẩn lạc Plasmid pGEM - T Easy có chứa gene lacZ. Khi DNA ngoại lai chèn vào điểm cắt giới hạn làm phá vỡ khung đọc β - galactosidase, làm cho vi khuẩn không tổng hợp được enzyme β - galactosidase để phân huỷ cơ chất X-Gal làm cơ chất không tạo màu, hình thành khuẩn lạc trắng.

Ngược lại, khi DNA ngoại lai không chèn vào được gene lacZ, cấu trúc gene giữ nguyên, enzyme được tổng hợp làm phân huỷ X-Gal, hình thành khuẩn lạc màu xanh. Dựa vào đặc điểm đó, khuẩn lạc trắng là khuẩn lạc mang gene được chèn và cần được chọn. Thực hiện tăng sinh khuẩn lạc trong môi trường LB/ampicillin và ly trích thu plasmid bằng nhiệt. Sau đó thực hiện phản ứng PCR để kiểm tra plasmid thu nhận được. Thành phần phản ứng gồm: 12,5 µl Go Taq G2 Green master mix 1X, 1 µl Primer T7 (0,4 µM), 1 µl Primer SP6 (0,4 µM), 5 µl Plasmid và thêm nước để tổng thể tích đạt 25 ul. Quy trình nhiệt gồm 1 chu kì ở 95ºC, 5 phút; 35 chu kì với 30 giây ở 95ºC, 30 giây ở 45ºC, 1,5 phút ở 72ºC; kết thúc tại 72ºC trong 10 phút. Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel 1,5% để kiểm tra.

Ly trích plasmid tái tổ hợp

Sử dụng kit GenJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo, Mỹ) để ly trích.

2.3.3. Giải trình tự và phân tích đa dạng di truyền

Sản phẩm ly trích plasmid được thu nhận sẽ gửi sang công ty Nam Khoa để tiến hành giải trình tự hai chiều với mồi T7 và SP6. Kết quả giải trình tự được xử lý và phân tích bằng phần mềm Sequencher 5.4.6 (Genecodes). Trình tự nucleotide của các mẫu được phân tích và so sánh với các trình tự tham khảo thuộc phân nhóm 2.1c và 2.2 (Bảng 2) và các trình tự đã công bố trên ngân hàng gene bằng trang web NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov).

Bảng 2. *Danh sách trình tự các chủng CSFV tham khảo dùng trong so sánh trình tự gene E2 trên NCBI*

STT	Tên chủng	Nơi phân lập	Năm	Phân nhóm	Mã số truy cập ngân hàng gene
1	GD53.2011	Trung Quốc	2011	2.1c	**KP343640**
2	HNLY-2011	Trung Quốc	2011	2.1c	**JX262391**
3	HNSD-2012	Trung Quốc	2012	2.1c	**JX218094**
4	GXF29.2013	Trung Quốc	2013	2.1c	**KP233070**
5	CSF0073	Áo	1990	2.2	**JQ411562**
6	84-KS1	Đài Loan	1995	2.2	**AY526729**
7	CSF0573	Ý	1998	2.2	**JQ411579**
8	Nghe An.2013	Việt Nam	2013	2.2	**LC388757**

3. Kết quả và bàn luận

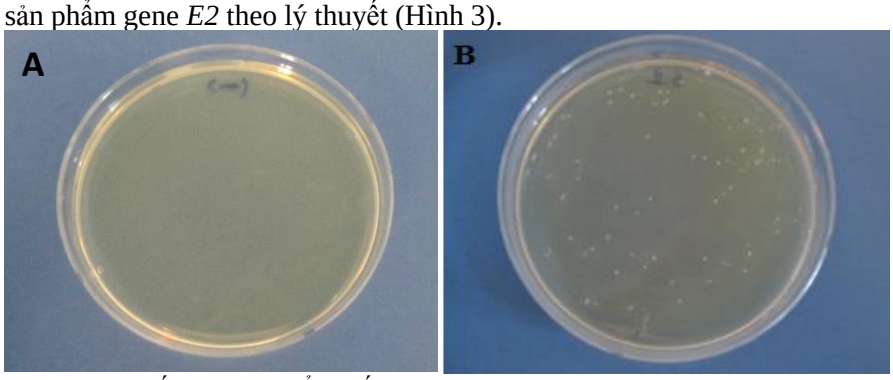
3.1. Kết quả thu nhận gene E2 của CSFV bằng kỹ thuật RT - PCR

Trong nghiên cứu này, 21 mẫu bệnh phẩm dương tính với CSFV được thu thập ở các tỉnh Đồng Nai, Bà Rịa - Vũng Tàu, Bình Dương, Lâm Đồng, Tiền Giang, Khánh Hoà, Long An, Tây Ninh và thành phố Hồ Chí Minh từ heo bệnh. Sau đó được tách chiết RNA tổng số bằng kit GeneJET Viral DNA and RNA Purification Kit và tổng hợp cDNA. Gene *E2* được nhân lên bằng kỹ thuật RT - PCR nhờ cặp mồi (Bảng 1) và kết quả khuếch đại đoạn gene *E2* được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% và chỉ thấy trên một vạch duy nhất tương ứng khoảng 1141 bp (Hình 1).

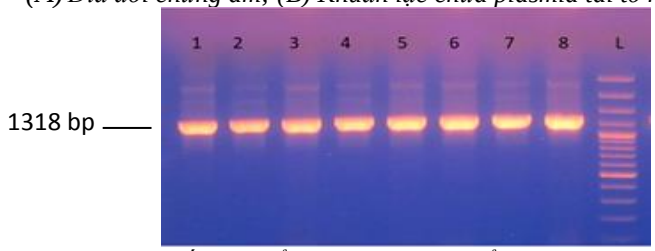
Hình 1. *Kết quả điện di sản phẩm RT - PCR khuếch đại đoạn gene E2*
(L): Thang DNA 100 bp Plus; (1): HVLD1; (2): HVDN1; (3): HVVT1; (4): HVDN2.

3.2. Kết quả tạo dòng gene E2 vào vector pGEM - T Easy

Sản phẩm RT - PCR sau khi được tinh sạch nhờ kit GeneJET Gel Extraction and DNA Cleaup Micro Kit được ghép nối trực tiếp với vector pGEM - T Easy (Promega). Sản phẩm của phản ứng nối được biến nạp vào tế bào khả nạp *E. coli* chủng DH5α và cấy trải trên môi trường chọn lọc LA có bổ sung chất kháng sinh ampicillin 100 µg/ml, chất cảm ứng IPTG và cơ chất X - Gal. Plasmid tái tổ hợp từ những khuẩn lạc màu trắng (Hình 2) được ly trích bằng nhiệt ở 95^{o}C trong vòng 10 phút. Kiểm tra các plasmid tái tổ hợp thu nhận được bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu là T7/SP6 có kích thước 177 bp trên vector pGEM - T Easy chưa có gene chèn. Sản phẩm sau đó được điện di trên gel agarose 1%, kết quả điện di trên gel agarose cho thấy, với cặp primer T7/SP6 đặc hiệu thu được một băng DNA có kích thước khoảng 1318 bp phù hợp với kích thước sản phẩm gene *E2* theo lý thuyết (Hình 3).



Hình 2. *Kết quả sản phẩm biến nạp trên môi trường LA/amp/IPTG/X - Gal*
(A) Đĩa đối chứng âm; (B) Khuẩn lạc chứa plasmid tái tổ hợp



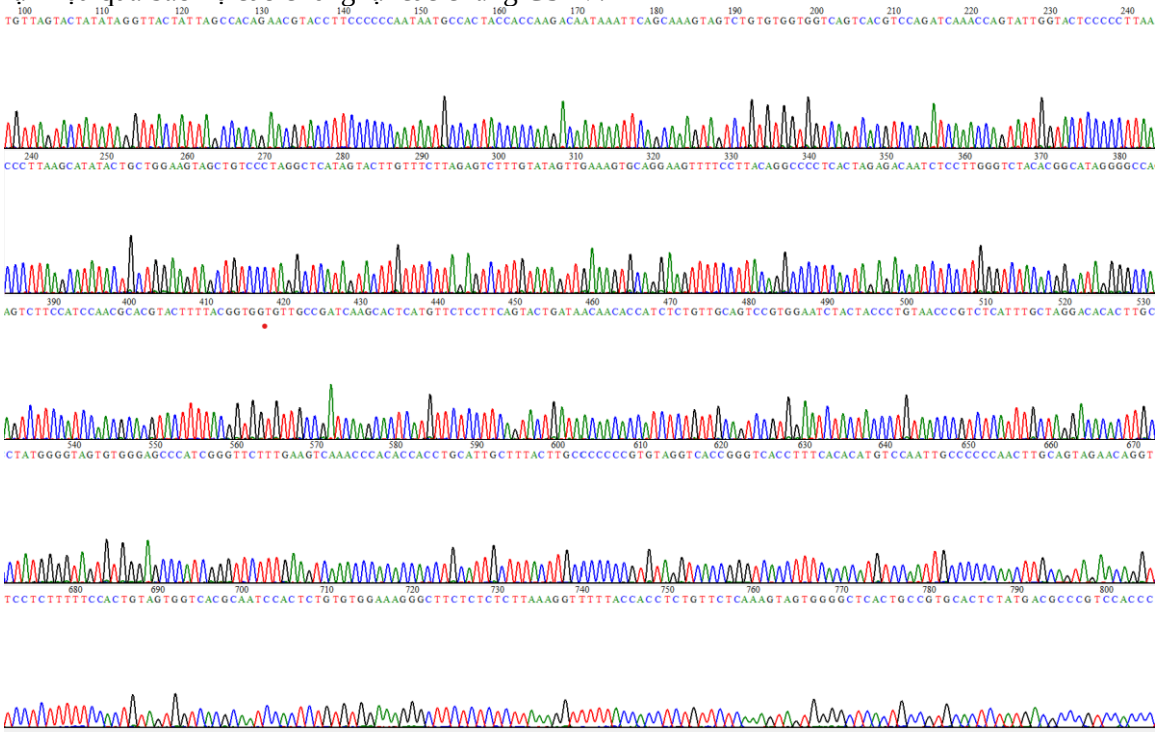
Hình 3. *Kết quả kiểm tra plasmid tái tổ hợp gene E2*
(L): Thang DNA 100 bp; (1): mẫu HVLD1; (2): mẫu HVDN1; (3): mẫu HVVT1; (4): mẫu HVDN2; (5): mẫu HVVT2; (6): mẫu HVTN1; (7): mẫu HVTG1; (8): mẫu HVLA1

3.3. Kết quả giải trình tự đoạn gene E2

Kết quả giải trình tự nucleotide cho thấy, gene *E2* thu được từ 21 dòng *E. coli* biến nạp trong nghiên cứu đã được giải trình tự thành công và chính xác với các đỉnh peak rõ ràng, không bị chồng lấn lên nhau (Hình 4). Tất cả 21 trình tự đoạn gen E2 được đăng kí trên GenBank với số truy cập từ MZ869026-MZ869046.

Kết quả phân tích bằng BLSST trên NCBI cho thấy các trình tự gene *E2* được biến nạp trong nghiên cứu đều ở mức độ tương đồng cao với các trình tự *E2* trình tự của CSFV trên GenBank. Bên cạnh đó, các trình tự này có độ tương đồng rất cao, 87,94 – 98,84%, khi so sánh với 100 trình tự có độ tương đồng cao nhất trên NCBI (Bảng 3). Những kết quả này cho thấy nghiên cứu đã thành công trong việc tạo các dòng *E. coli* mang gene *E2* của 21 chủng CSFV tại Việt Nam. Sự thành công này sẽ là cơ sở quan trọng để chúng tôi tiếp tục nghiên cứu tạo ra protein E2 tái tổ hợp, là nguyên liệu cho các loại vaccine tiểu đơn vị chống lại bệnh CSF. Thực tế, protein E2 chịu trách nhiệm chính trong việc kích ứng tạo ra các kháng thể trung hòa CSFV, hình thành miễn dịch bảo hộ trong quá trình nhiễm trùng [15]. Trong số các protein của CSFV, E2 là một trong hai kháng nguyên chủ yếu được dùng để sản xuất vaccine [16]. Vaccine tiểu đơn vị dựa trên E2

đã được chứng minh có tác dụng bảo vệ và tạo ra kháng thể trung hòa với hiệu giá cao [17]. Theo nhiều nghiên cứu đưa ra thì một mình E2 có thể tạo kháng thể bảo vệ heo chống lại CSFV [18], [19]. Hơn nữa, các epitope trung hòa được bảo tồn của CSFV [20] đã được xác định trên protein này. Do đó, vaccine tiểu đơn vị được phát triển trên cơ sở E2 là những vaccine tiềm năng mang lại hiệu quả bảo hộ cao chống lại các chủng CSFV.



Hình 4. *Một phần kết quả giải trình tự gene E2 của chủng HVLD1 thu được từ mẫu huyết thanh heo bệnh*

Bảng 3. *Kết quả Blast các trình tự gene E2 của CSFV được biến nạp với 100 trình tự có độ tương đồng cao nhất trên NCBI*

Trình tự	Điểm cao nhất	Tổng điểm	Tỉ lệ bao phủ (%)	Mức độ giống nhau ngẫu nhiên (%)	Phần trăm tương đồng (%)	Phân loại học
HVDN1	1558-1927	1558-1927	97-100	0	90,8-96,51	Classical swine fever virus
HVDN2	1523-1892	1523-1892	97-100	0	90,26-95,98	Classical swine fever virus
HVDN3	1575-2054	1575-2054	97-100	0	91,06-98,48	Classical swine fever virus
HVDN4	1569-1915	1569-1915	97-100	0	90,97-96,34	Classical swine fever virus
HVDN5	1575-1944	1575-1944	97-100	0	91,06-96,78	Classical swine fever virus
HVDN6	1563-1297	1563-1297	97-100	0	90,88-96,51	Classical swine fever virus
HVDN7	1540-1909	1540-1909	97-100	0	90,53-96,25	Classical swine fever virus
HVDN8	1540-1904	1540-1904	97-100	0	90,53-96,16	Classical swine fever virus
HVDN9	1529-1898	1529-1898	97-100	0	90,35-96,07	Classical swine fever virus
HVDN10	1558-2059	1558-2059	97-100	0	90,80-98,57	Classical swine fever virus
HVVT1	1546-1909	1546-1909	97-100	0	90,62-96,25	Classical swine fever virus
HVVT2	1552-1927	1552-1927	97-100	0	90,71-96,51	Classical swine fever virus
HVVT3	1546-1915	1546-1915	97-100	0	90,62-96,34	Classical swine fever virus
HVVT4	1546-1921	1546-1921	97-100	0	90,62-96,43	Classical swine fever virus
HVKH1	1563-2059	1563-2059	97-100	0	90,88-98,57	Classical swine fever virus
HVHCM1	1546-2077	1546-2077	97-100	0	90,62-98,84	Classical swine fever virus
HVLA1	1373-1967	1373-1967	97-100	0	87,94-97,14	Classical swine fever virus
HVTG1	1563-1932	1563-1932	97-100	0	90,88-96,60	Classical swine fever virus
HVTN1	1373-1973	1373-1973	97-100	0	87,94-97,23	Classical swine fever virus
HVBD1	1563-1915	1563-1915	97-100	0	90,88-96,34	Classical swine fever virus
HVLD1	1575-1944	1575-1944	97-100	0	91,06-96,78	Classical swine fever virus

21 chủng CSFV phân lập trong nghiên cứu này đã được nhóm tác giả xây dựng cây sinh dòng và được phân tích sâu hơn về sự biến đổi ở các vùng kháng nguyên quan trọng [21]. Kết quả cho thấy rằng các chủng CSFV này thuộc phân nhóm 2.2 và 2.1c. Nhằm xác định sự phân nhóm của 21 trình tự gene *E2* trong nghiên cứu, chúng tôi tiến hành so sánh độ tương đồng với các chủng CSFV thuộc hai phân nhóm 2.1c và 2.2 (Bảng 4). 19 trình tự có độ tương đồng rất cao với các chủng thuộc phân nhóm 2.1c với 95 – 96,34%, nhưng khá thấp với các chủng thuộc phân nhóm 2.2 (86,44 – 88,29%). Hai trình tự còn lại (HVLA1 và HVTN1) chỉ có tương đồng ở mức 87,41 – 87,94% với các chủng tham khảo thuộc phân nhóm 2.1c, nhưng lại tương đồng rất cao 92,05 – 93,03% với các chủng trong phân nhóm 2.2. Một số nghiên cứu di truyền của CSFV ở Việt Nam đã chỉ ra rằng, những chủng CSFV được thu thập tại khu vực đồng bằng sông Cửu Long ở miền Nam Việt Nam từ năm 2001 đến 2003 chia thành hai phân nhóm, phần lớn nằm trong phân nhóm 2.1 và còn lại trong phân nhóm 2.2 [6]. Những kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Lê Thị Thu Phương và cộng sự (2010) cho rằng 37 chủng CSFV thực địa từ 12 tỉnh thành phía Nam Việt Nam trong giai đoạn 2000 – 2009 đều thuộc nhóm 2 với phân nhóm 2.1 và 2.2 [22].

Bảng 4. *Kết quả so sánh trình tự gene E2 giữa các plasmid trong nghiên cứu và các chủng CSFV tham khảo*

	Phân nhóm 2.1c				**Phân nhóm 2.2**			
	KP233070	**JX262391**	**KP343640**	**JX218094**	**AY526729**	**JQ411579**	**LC388757**	**JQ411562**
HVDN1	95,53	96,07	95,98	95,98	88,03	87,22	87,40	87,85
HVDN2	95,00	95,53	95,44	95,44	87,31	86,52	86,68	87,13
HVDN3	95,71	96,25	95,89	95,71	88,11	86,86	87,04	87,94
HVDN4	95,53	95.89	95,80	95,8	87,85	86,95	87,13	87,58
HVDN5	95,62	96,34	96,25	96,16	88,11	87,23	87,31	87,94
HVDN6	95,53	96,07	95,98	95,98	87,76	86,95	87,13	87,58
HVDN7	95,35	95,71	95,62	95,62	87,85	87,04	87,31	87,85
HVDN8	95,17	95,71	95,62	95,62	87,76	86,86	87,13	87,58
HVDN9	95,26	95,62	95,53	95,53	87,94	86,95	87,31	87,40
HVDN10	95,71	96,25	95,89	95,71	88,04	86,96	87,05	87,86
HVBD1	95,17	95,89	95,80	95,80	88,29	87,40	87,67	87,94
HVLD1	95,62	96,34	96,25	96,16	88,11	87,23	87,31	87,94
HVVT1	95,08	95,80	95,71	95,71	87,67	87,13	87,15	87,80
HVVT2	95,35	96,07	95,98	95,98	87,85	86,95	87,4	87,67
HVVT3	95,35	95,89	95,80	95,80	87,85	87,04	87,31	87,67
HVVT4	95,35	96,07	95,98	95,98	87,85	86,95	87,40	87,67
HVKH1	95,80	96,34	95,98	95,80	87,94	86,86	86,95	87,76
HVHCM1	95,54	96,07	95,63	95,54	87,61	86,44	86,80	87,69
HVLA1	87,67	87,76	87,94	87,58	92,05	92,67	93,03	92,40
HVTG1	95,62	96,16	96,07	95,98	87,94	87,05	87,13	87,76
HVTN1	87,41	87,68	87,86	87,50	92,05	93,03	93,03	92,67

4. Kết luận

Nghiên cứu đã thành công tạo ra 21 dòng *E. coli* mang plasmid chứa đầy đủ trình tự của gene *E2* từ 21 mẫu CSFV thực địa và cho thấy các dòng này thuộc nhóm phụ 2.2 và 2.1c. Kết quả này tạo tiền đề cho chiến lược nghiên cứu và phát triển vaccine tiểu đơn vị phòng chống CSFV tại Việt Nam. Cần thực hiện nghiên cứu khảo sát đa dạng di truyền của CSFV với lượng mẫu lớn hơn và thêm nhiều địa điểm khác nhau ở miền Trung và Bắc để đánh giá toàn diện về đặc điểm di truyền của CSFV tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

[1] P. Lowings, G. Ibata, J. Needham, and D. Paton, "Classical swine fever virus diversity and evolution," *Journal of General Virology*, vol. 77, no. 6, pp. 1311-1321, 1996.

[2] D. Paton, A. McGoldrick, I. Greiser-Wilke, S. Parchariyanon, J.-Y. Song, P. Liou, T. Stadejek, J. Lowings, H. Björklund, and S. Belak, "Genetic typing of classical swine fever virus," *Veterinary microbiology*, vol. 73, no. 2-3, pp. 137-157, 2000.

[3] M.-C. Deng, C.-C. Huang, T.-S. Huang, C.-Y. Chang, Y.-J. Lin, M.-S. Chien, and M.-H. Jong, "Phylogenetic analysis of classical swine fever virus isolated from Taiwan," *Veterinary microbiology*, vol. 106, no. 3-4, pp. 187-193, 2005.

[4] C. Pan, M. Jong, T. Huang, H. Liu, S. Lin, and S. Lai, "Phylogenetic analysis of classical swine fever virus in Taiwan," *Archives of Virology*, vol. 150, no. 6, pp. 1101-1119, 2005.

[5] W. Gong, J. Wu, Z. Lu, L. Zhang, S. Qin, F. Chen, Z. Peng, Q. Wang, L. Ma, and A. Bai, "Genetic diversity of subgenotype 2.1 isolates of classical swine fever virus," *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 41, pp. 218-226, 2016.

[6] A. Kamakawa, H. T. V. Thu, and S. Yamada, "Epidemiological survey of viral diseases of pigs in the Mekong delta of Vietnam between 1999 and 2003," *Veterinary Microbiology*, vol. 118, no. 1-2, pp. 47-56, 2006.

[7] A. Töpfer, D. Höper, S. Blome, M. Beer, N. Beerenwinkel, N. Ruggli, and I. Leifer, "Sequencing approach to analyze the role of quasispecies for classical swine fever," *Virology*, vol. 438, no. 1, pp. 14-19, 2013.

[8] U. Fahnøe, A. G. Pedersen, P. C. Risager, J. Nielsen, G. J. Belsham, D. Höper, M. Beer, and T. B. Rasmussen, "Rescue of the highly virulent classical swine fever virus strain "Koslov" from cloned cDNA and first insights into genome variations relevant for virulence," *Virology*, vol. 468, pp. 379-387, 2014.

[9] A. Postel, S. Schmeiser, J. Bernau, A. Meindl-Boehmer, G. Pridotkas, Z. Dirbakova, M. Mojzis, and P. Becher, "Improved strategy for phylogenetic analysis of classical swine fever virus based on full-length E2 encoding sequences," *Veterinary research*, vol. 43, no. 1, pp. 1-15, 2012.

[10] M. Beer, K.V. Goller, C. Staubach, and S. Blome, "Genetic variability and distribution of Classical swine fever virus," *Animal Health Research Reviews*, vol. 16, no. 1, pp. 33-39, 2015.

[11] M. König, T. Lengsfeld, T. Pauly, R. Stark, and H.-J. Thiel, "Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins," *Journal of virology*, vol. 69, no. 10, pp. 6479-6486, 1995.

[12] A. Clavijo, M. Lin, J. Riva, and E.-M. Zhou, "Application of competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the serologic diagnosis of classical swine fever virus infection," *Journal of veterinary diagnostic investigation*, vol. 13, no. 4, pp. 357-360, 2001.

[13] H. Zhang, W. Wen, Z. Zhao, J. Wang, H. Chen, P. Qian, and X. Li, "Enhanced protective immunity to CSFV E2 subunit vaccine by using IFN-γ as immunoadjuvant in weaning piglets," *Vaccine*, vol. 36, no. 48, pp. 7353-7360, 2018.

[14] S. Yao, D. J. Hart, and Y. An, "Recent advances in universal TA cloning methods for use in function studies," *Protein Engineering, Design and Selection*, vol. 29, no. 11, pp. 551-556, 2016.

[15] Y. Qi, B.-Q. Zhang, Z. Shen, and Y.-H. Chen, "Candidate vaccine focused on a classical swine fever virus epitope induced antibodies with neutralizing activity," *Viral immunology*, vol. 22, no. 3, pp. 205-213, 2009.

[16] X.-N. Dong and Y.-H. Chen, "Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines," *Vaccine*, vol. 25, no. 2, pp. 205-230, 2007.

[17] A. Bouma, A. De Smit, E. De Kluijver, C. Terpstra, and R. Moormann, "Efficacy and stability of a subunit vaccine based on glycoprotein E2 of classical swine fever virus," *Veterinary microbiology*, vol. 66, no. 2, pp. 101-114, 1999.

[18] M. Hulst, D. Westra, G. Wensvoort, and R. Moormann, "Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera," *Journal of Virology*, vol. 67, no. 9, pp. 5435-5442, 1993.

[19] P. Van Rijn, A. Bossers, G. Wensvoort, and R. Moormann, "Classical swine fever virus (CSFV) envelope glycoprotein E2 containing one structural antigenic unit protects pigs from lethal CSFV challenge," *Journal of General Virology*, vol. 77, no. 11, pp. 2737-2745, 1996.

[20] G. Wensvoort, "Topographical and functional mapping of epitopes on hog cholera virus with monoclonal antibodies," *Journal of general virology*, vol. 70, no. 11, pp. 2865-2876, 1989.

[21] N. H. Nguyen, B. T. P. Nguyen, D. T. Do, T. Q. Nguyen, D. T. M. Nguyen, and M. N. Nguyen, "Genetic diversity and molecular characterization of classical swine fever virus envelope protein genes E2 and Erns circulating in Vietnam from 2017 to 2019," *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 96, no. p. 105140, 2021.

[22] T. T. P. Le, T. T. H. Nguyen, V. P. Kim, X. H. Tran, A. T. Bui, H. Dang, D. T. Tran, C. J. Morrissy, F. Wong, V. Stevens, and K. Davies, "Genetic analysis of swine cholera virus in some southern provinces of Vietnam," *Journal of Veterinary science and technology*, vol. XVII, no. 2, pp. 5-11, 2010.