

NGHIÊN CỨU ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH CỦA CHUỘT Babl/C VỚI KHÁNG NGUYÊN TIÊN MAO CỦA VI KHUẨN *E.coli* O157:H7

Phạm Thị Tâm¹, Phạm Công Hoat², Tô Long Thành³

Tóm tắt:

Mục đích của nghiên cứu này là xác định điều kiện thích hợp cho khả năng gây đáp ứng miễn dịch trên chuột Babl/C của kháng nguyên tiên mao của vi khuẩn *E.coli* O157:H7. Với các hàm lượng kháng nguyên là 50µg/ml, 100µg/ml, 200µg/ml, chúng tôi đã xác định được 100µg/ml (tương đương với 30µg/chuột) là hàm lượng thích hợp nhất để gây đáp ứng trên chuột. Còn trong nghiên cứu ảnh hưởng của các chất bổ trợ kháng nguyên, chúng tôi xác định rằng dầu Montanide ISA70 là chất bổ trợ thích hợp, làm tăng khả năng kích thích gây đáp ứng miễn dịch của chuột với kháng nguyên H7. Với các điều kiện gây miễn dịch cho chuột Babl/C là: gây nhiễm vào phúc mạc, hàm lượng kháng nguyên 100µg/ml, dầu bổ trợ Montanide ISA70, sau 10 ngày chuột đã bắt đầu có đáp ứng mạnh với kháng nguyên và tăng duy trì, đạt ngưỡng cao từ ngày thứ 45 cho đến thời điểm thu lách chuột là ngày thứ 60. Bằng phản ứng WESTERN BLOT đã xác định được kháng thể tạo thành trên chuột có khả năng phát hiện đặc hiệu tiểu phần kháng nguyên tiên mao có trọng lượng là 65Kda.

Từ khoá: *E.coli* O157:H7, Chuột Babl/C, Kháng nguyên tiên mao, Đáp ứng miễn dịch, Dầu bổ trợ

IMMUNE RESPONSE IN Babl/C MICE OF FLAGELLAR ANTIGEN OF *E.coli* O157:H7

Phạm Thị Tâm, Phạm Công Hoat, Tô Long Thành

Summary

The purpose of this study was to determine the appropriate conditions that influence to immune response in Babl/C mice of flagellar antigen of *E.coli* O157: H7. BALB/c mice immunized 3 times with different doses 50 µg, 100µg, 200µg of protein, we have identified 100µg/ml (equivalent 30µg/mice) is the most appropriate antigen concentration to cause response in mice. In the experiment to assess the effect of adjuvant, we determined that the Montanide ISA70 is an appropriate adjuvant, that help increasing the immune response in mice with antigen H7. By the immune conditions as: peritoneal injection, antigen 100µg/ml, adjuvant Montanide ISA70, after 10 days immunized, response in mice strongly and increased maintain a high level from day 45 until the spleen collection day is the day 60th. By Western blot method, specific antibody in mice can determine the section weight 65Kda of flagellar antigen.

Keywords: *E.coli* O157:H7, Babl/C mice, Flagellar antigen, Immune response, Adjuvant oil

¹ Khoa Công nghệ sinh học, Viện Đại học Mở Hà Nội

² Bộ Khoa học và Công nghệ

³ Cục Thú y- Bộ NN&PTNT

I. Đặt vấn đề

Vi khuẩn *E.coli* O157:H7 là vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm duy nhất thuộc loài *E.coli*. Thành phần kháng nguyên của vi khuẩn này gồm 3 nhóm chính, bao gồm: kháng nguyên thân (O157), kháng nguyên tiên mao (H7), kháng nguyên giáp mô (K88), tuy nhiên, trong chẩn đoán, xác định sự có mặt của vi khuẩn này, người ta thường sử dụng các hệ thống chẩn đoán kháng nguyên H (Orskov, 1984) [4].

Trong các KIT chẩn đoán miễn dịch học để phát hiện vi khuẩn *E.coli* O157:H7 người ta thường sử dụng các kháng thể đơn dòng đặc hiệu với kháng nguyên H7 [8]. Các kháng thể này được sản xuất bằng phương pháp lai cùng loài giữa tế bào lách chuột mẫn cảm với kháng nguyên và tế bào u tủy chuột (myeloma). Một trong những yếu tố chính, có ảnh hưởng lớn đến kết quả nghiên cứu sản xuất kháng thể đơn dòng đặc hiệu đó là đáp ứng của chuột đối với kháng nguyên. Đối với vi khuẩn *E.coli* O157:H7, trong nghiên cứu trước chúng tôi đã xác định được kháng nguyên H7 là kháng nguyên có khả năng gây đáp ứng miễn dịch cao trên thỏ [5], đồng thời mục đích của chúng tôi là tạo ra kháng thể đơn dòng đặc hiệu để phát hiện kháng nguyên H7 của *E.coli* O157:H7, vì vậy, chúng tôi đã sử dụng kháng nguyên này gây miễn dịch cho chuột Babl/C. Lách chuột mẫn cảm sẽ sử dụng cho mục đích tạo tế bào lai mang kháng thể đơn dòng ở điều kiện *in vitro*. Vấn đề đặt ra là phải xác định được ở điều kiện gây miễn dịch nào thì kháng nguyên gây đáp ứng miễn dịch trên chuột mạnh nhất để tạo ra số lượng tế bào lympho B thích hợp cho mục đích dung hợp tế bào.

II. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên liệu

- Kháng nguyên H7 của chủng vi khuẩn *E.coli* O157:H7 do Trường đại học Khoa học tự nhiên cung cấp
- Chuột Babl/C

2.2 Phương pháp nghiên cứu

* **Phương pháp chế kháng nguyên lông(H) [3].**

Vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường flagellum broth (2% peptone water, 1% cao thịt bò, 0,5% glucose) ở 37°C lắc trong trong 24 giờ. Ly tâm canh khuẩn ở 15.000 rpm, 4°C trong 1 giờ, thu tế bào. Tiên mao của vi khuẩn được thu hoạch bằng cách ly tâm thu dịch nổi sau khi tách bằng máy blender.

* **Phương pháp gây miễn dịch trên chuột Babl/C [7]**

- Chuẩn bị chất gây miễn dịch (immunogen) như sau: kháng nguyên H7 được bổ sung FCA hoặc FIA để đạt nồng độ thích hợp.
- Gây miễn dịch cơ sở (MDCS): tiêm 0,5ml kháng nguyên trong FCA/con chuột
- Gây miễn dịch thứ cấp:
 - + Lần 1: 10 ngày sau MDCS, tiêm 0,5ml kháng nguyên trong FIA/chuột. Sau 10 ngày, lấy máu kiểm tra hiệu giá kháng thể (HGKT).
 - + Lần 2: 35 ngày sau MDCS và lặp lại quy trình của lần 1. 60 ngày sau MDCS giết chuột, thu lách và huyết thanh.

*** Điện di trên gel SDS – Polyacrylamide (SDS – PAGE)**

Protein kháng nguyên được điện di trên gel polyacrylamide bán liên tục có chứa SDS 12% acrylamide. Lượng protein đưa vào mỗi giếng là 17 μg .

*** Phản ứng ELISA gián tiếp [7]**

Phản ứng được thực hiện với kháng nguyên pha loãng 5 μg /giếng, kháng thể 1/600, anti-rabbit IgG HPR (Sigma) 1/10.000, cơ chất sinh màu TMB.

III. Kết quả và thảo luận

3.1 Xác định hàm lượng kháng nguyên thích hợp cho khả năng gây đáp ứng miễn dịch trên chuột

Đáp ứng của động vật không chỉ phụ thuộc vào loại kháng nguyên mà còn phụ thuộc nhiều vào các yếu tố như: đường tiêm, hàm lượng kháng nguyên và chất bổ trợ. Đối với chuột Balb/C, theo nghiên cứu của Freeman và cộng sự, 1983 [2], thì đưa kháng nguyên vào xoang phúc mạc cho đáp ứng miễn dịch mạnh hơn so với tiêm dưới da. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện gây đáp ứng miễn dịch cho chuột với kháng nguyên tiên mao của vi khuẩn *E.coli* O157:H7 theo đường phúc mạc.

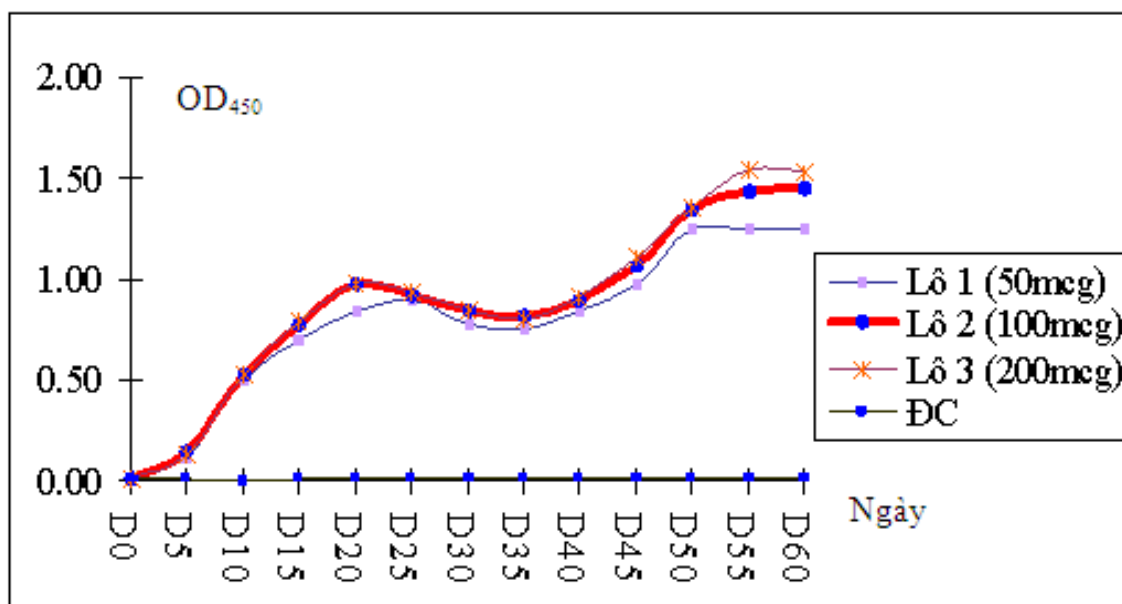
Chúng tôi đã sử dụng 3 nồng độ kháng nguyên tiên mao của vi khuẩn *E.coli* O157:H7 để tiêm vào xoang phúc mạc của chuột, cụ thể là: 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Mỗi lô chuột thí nghiệm có 3 con, mỗi con được tiêm 0,3ml kháng nguyên ở nồng độ trên. Lô đối chứng, chuột được tiêm 0,3ml dung dịch PBS vô trùng. Các lô chuột được tiêm kháng nguyên hoặc PBS nhắc lại vào các ngày thứ 10 và 35. 5 ngày 1 lần, định kỳ lấy máu đuôi chuột để kiểm tra hiệu giá kháng thể bằng phản ứng ELISA, độ pha loãng huyết thanh cho phản ứng này là 1/600.

Kết quả thí nghiệm được trình bày trong bảng 1 và biểu đồ 1.

Bảng 1 Kết quả theo dõi thí nghiệm ảnh hưởng của liều lượng kháng nguyên đến đáp ứng miễn dịch của chuột

Lô TN	Liều kháng nguyên	OD_{450} trung bình	OD_{450}^* (ngày thứ nhất)	OD_{450}^* (ngày thứ 10)	OD_{450}^* (ngày thứ 35)	OD_{450}^* (ngày thứ 60)
Lô I	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,78	0,09	0,50	0,75	1,25
Lô II	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,86	0,09	0,53	0,82	1,45
Lô III	200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,88	0,10	0,52	0,80	1,53
ĐC	PBS	0,06	0,09	0,08	0,06	0,06

Từ bảng 1 chúng tôi nhận thấy, hàm lượng kháng nguyên càng cao thì đáp ứng miễn dịch của chuột càng mạnh, thể hiện là OD_{450} trung bình qua 60 ngày theo dõi của lô chuột được tiêm kháng nguyên với hàm lượng 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ đạt giá trị cao nhất là 0,88. Tại thời điểm ngày thứ 60, giá trị OD thể hiện rõ nhất mối tương quan tỷ lệ thuận giữa hiệu giá kháng thể với hàm lượng kháng nguyên.



***Biểu đồ 1 Đáp ứng miễn dịch ở chuột được tiêm
kháng nguyên H7 với các hàm lượng khác nhau***

Kết quả theo dõi đáp ứng miễn dịch của chuột với kháng nguyên tiền mao của vi khuẩn *E.coli* O157:H7 thể hiện trong biểu đồ 1 cho thấy: sau khi gây miễn dịch cơ sở, kháng thể bắt đầu hình thành và tăng dần, đạt ngưỡng tối đa ở ngày thứ 20 sau đó đáp ứng của chuột với kháng nguyên giảm dần từ ngày thứ 25 và tiếp tục giảm cho đến ngày thứ 35. Tại thời điểm này, chúng tôi tiến hành gây miễn dịch lần 3 cho chuột. Sau lần tiêm kháng nguyên này, kháng thể trong chuột tăng lên nhanh và mạnh, cho đến ngày thứ 45 thì tất cả các lô chuột thí nghiệm đều có giá trị $OD_{450} > 1$. Nhìn chung, biến thiên hiệu giá kháng thể ở chuột được tiêm kháng nguyên tiền mao cũng tương tự như thỏ, đó là sau khi tiêm nhắc lại lần 2, hiệu giá kháng thể giảm nhẹ sau đó lại tăng dần ở các ngày sau đó.

So sánh về khả năng gây đáp ứng miễn dịch cho chuột ở 3 lô kháng nguyên, chúng tôi thấy có sự sai khác rõ rệt giữa đáp ứng miễn dịch của chuột ở các lô thí nghiệm và lô đối chứng ($P < 0,0001$). Bên cạnh đó, so sánh giữa các lô thí nghiệm I và II, I và III, chúng tôi cũng thấy có sự khác biệt về lượng kháng thể tạo thành ($p > 0,003$). Tuy nhiên, khi so sánh đáp ứng miễn dịch tạo thành trong hai lô chuột II và III, chúng tôi lại thấy kháng thể tạo thành trong hai lô này không khác nhau ($p > 0,1$) (số liệu không trình bày). Như vậy, từ thí nghiệm này, chúng tôi đã xác định được hàm lượng kháng nguyên thích hợp để gây đáp ứng miễn dịch trên chuột là $100\mu\text{g/ml}$, tương đương với $30\mu\text{g/chuột}$.

3.2 Ảnh hưởng của chất bổ trợ đến khả năng tạo đáp ứng miễn dịch của chuột với kháng nguyên H7

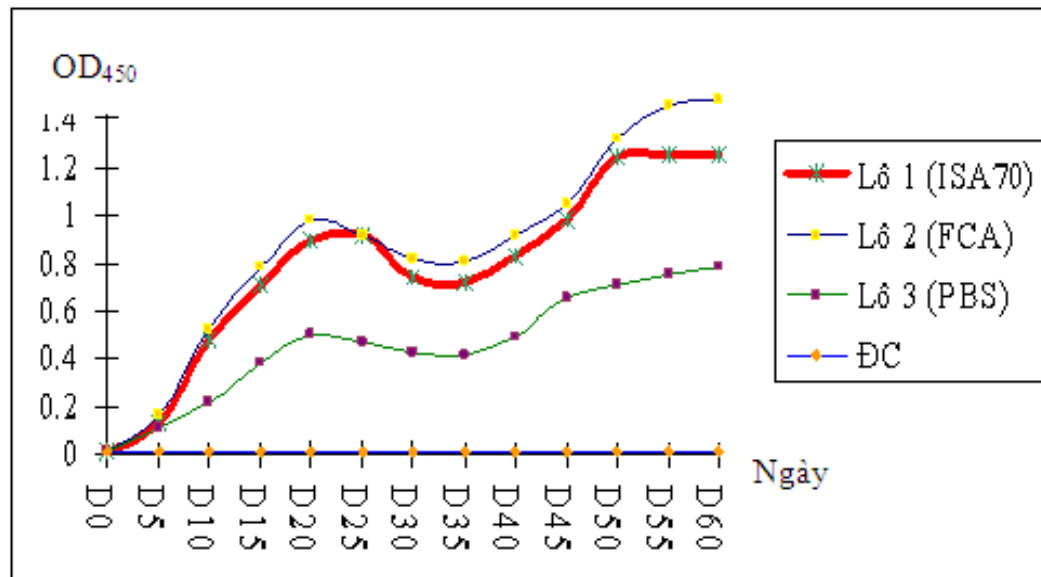
Một trong những yếu tố quan trọng giúp tăng khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch của kháng nguyên đối với động vật đó là chất bổ trợ. Theo nghiên cứu của Bahnemann và cộng sự, 1987 [1], nhũ dầu Montanide được xác định là chất mang kháng nguyên, có tác dụng tạo đáp ứng sinh kháng thể mạnh trong thời gian dài. Bên cạnh đó,

Robinson và cộng sự, 1994 [6] lại chứng minh rằng dầu Freund's lại có tác dụng kích thích lợn thí nghiệm sinh đáp ứng mạnh với kháng nguyên.

Trong thí nghiệm để lựa chọn chất bổ trợ kháng nguyên tiêm cho chuột, chúng tôi thực hiện 3 lô thí nghiệm, với 3 chất bổ trợ là: i) dầu Montanide ISA 70, ii) Freund's và iii) PBS. Các chất bổ trợ này được phối trộn với kháng nguyên để đạt hàm lượng là 100µg/ml. Ở lô đối chứng, chuột được tiêm PBS vô trùng. Định kỳ lấy máu đuôi chuột 5 ngày/lần để kiểm tra đáp ứng tạo kháng thể. Kết quả thí nghiệm được thể hiện trong bảng 2 và biểu đồ 2.

Bảng 2 Kết quả theo dõi thí nghiệm ảnh hưởng của chất bổ trợ đến đáp ứng miễn dịch của chuột

Lô TN	OD_{450} trung bình	OD_{450}^* (ngày thứ 5)	OD_{450}^* (ngày thứ 10)	OD_{450}^* (ngày thứ 35)	OD_{450}^* (ngày thứ 60)
Lô I: ISA70 + kháng nguyên H7	0,78	0,13	0,48	0,72	1,25
Lô II: FCA/FIA+ kháng nguyên H7	0,86	0,16	0,52	0,8	1,48
Lô III: PBS+ kháng nguyên H7	0,45	0,11	0,22	0,41	0,78
Đối chứng: PBS	0,01	0,01	0,006	0,01	0,01



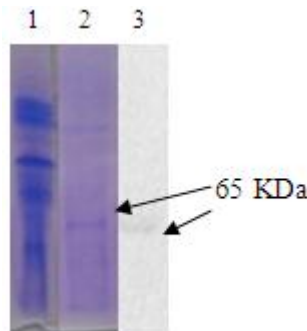
Biểu đồ 2 So sánh đáp ứng của chuột với kháng nguyên H7 được phối trộn với các chất bổ trợ khác nhau

Trong 5 ngày đầu sau khi gây miễn dịch, chuột ở tất cả các lô thí nghiệm sử dụng các chất bổ trợ khác nhau bao gồm Montanide ISA70, Freund's hay PBS đều cho đáp ứng miễn dịch tương đối giống nhau. Tuy nhiên, bắt đầu từ ngày thứ 35 sau khi gây miễn dịch trở đi, chuột ở các lô tiêm kháng nguyên phối trộn với các chất bổ trợ Montanide ISA70

và FCA đã có đáp ứng mạnh hơn nhiều so với lô tiêm kháng nguyên pha trong PBS, thể hiện là giá trị OD₄₅₀ cao gấp từ 1,6-1,9 lần. So sánh hiệu quả tạo đáp ứng miễn dịch của lô chuột được tiêm kháng nguyên với chất bổ trợ Montanide và Freund's chúng tôi thấy giá trị OD₄₅₀ trung bình ở lô chuột được tiêm kháng nguyên trong dầu bổ trợ Freund's cao hơn so với lô sử dụng dầu Montanide ISA70, điều này có nghĩa là hàm lượng kháng thể tạo ra trong lô chuột được tiêm với dầu Freund' cao hơn so với lô chuột được tiêm Montanide ISA70. Tuy nhiên so sánh kết quả thí nghiệm trên toàn bộ chuột trong hai lô thí nghiệm này, chúng tôi thấy sự sai khác giữa hai lô này là không đáng kể ($P>0,001$) (số liệu không trình bày).

Trong quá trình theo dõi chuột được gây miễn dịch với kháng nguyên trộn với các chất bổ trợ chúng tôi thấy: chuột ở các lô tiêm kháng nguyên có bổ sung dầu Freund's có hiện tượng nổi da, viêm loét tại nơi tiêm, hiện tượng viêm này dẫn tới tình trạng chuột có biểu hiện kém nhanh nhẹn hơn so với lô đối chứng cũng như 2 lô thí nghiệm còn lại. Vì vậy, trong thí nghiệm lựa chọn chất bổ trợ kháng nguyên để gây miễn dịch cho chuột Balb/C, chúng tôi xác định rằng dầu Montanide ISA 70 là chất bổ trợ thích hợp, làm tăng khả năng kích thích gây đáp ứng miễn dịch của chuột với kháng nguyên H7.

Bằng phương pháp Western Blot (WB), chúng tôi đã xác định được là: cũng như trong nghiên cứu đánh giá đáp ứng miễn dịch của kháng nguyên tiểu mao trên thỏ, tiểu phần protein có trọng lượng 65 Kda là tiểu phần có khả năng kích thích sinh kháng thể đặc hiệu trên chuột Balb/C (hình 1). Kết quả này cho phép kết luận, tiểu phần 65Kda chính là tiểu phần tạo nên tính đặc hiệu của kháng nguyên H7.



Hình 1 Kết quả xác định tiểu phần kháng nguyên sinh đáp ứng miễn dịch đặc hiệu trên chuột Balb/C

(1: thang protein chuẩn, 2: kháng nguyên H7 điện di trên gel SDS-PAGE, 3: kết quả WB giữa kháng nguyên H7 và huyết thanh chuột Balb/C gây nhiễm kháng nguyên này)

IV. Kết luận

Tóm lại, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định được liều tiêm kháng nguyên cho chuột là 30µg/con, chất bổ trợ kháng nguyên là Montanide ISA70. Kháng nguyên được đưa vào cơ thể chuột bằng đường tiêm vào xoang phúc mạc.

Tài liệu tham khảo

1. Bahnemann, H.G., Mesquita, J.A. (1987), Oil adjuvant vaccine against foot-and mouth disease, *Bol. Centr. Panam. Fiebre Afosa*, 53, 25–30.

2. Freeman R. R., Holder A. A. Characteristics of the protective response of Balb/C mice immunized with a purified *Plasmodium yoelii* schizont antigen, *Clin. exp. Immunol*, (1983) 54, 609-616) .
3. Fujita H, Yamaguchi S, Taira T, Iino T (1981). A simple method for the isolation of flagellar shape mutants in Salmonella. *J Gen Microbiol. Jul*;125(1):213–216.
4. Orskov, F., and I. Orskov. (1984), Serotyping of *Escherichia coli*, *Methods Microbiol*, 14:43–112.
5. Phạm Thị Tâm, Phạm Công Hoạt, Trần Thị Hạnh, Tô Long Thành, Lê Văn Nh-ơng, (2009), Nghiên cứu chế tạo và lựa chọn kháng nguyên của vi khuẩn *E.coli* O157:H7 phục vụ thiết lập phản ứng ELISA, *Tạp chí KHKT Thú y, tập 6, số 5/ 2009*, Tr 11-15
6. Robinson, K., Bellaby, T., Wakelin, D., 1994. Vaccination against the nematode *Trichinella spiralis* in high- and low-responder mice. Effects of different adjuvants upon protective immunity and immune responsiveness. *Immunology* 82, 261–26
7. Yoshihito Kihwaraki (2002). Immunological Laboratory techniques, Japan International Cooperation Agency.
8. <http://agris.fao.org/agrisresearch/search/display.do?f=1997/US/US97200.xml;US9728049>.