

Tiềm năng ứng dụng *Bacillus* làm probiotic và phát triển vaccine

PGS.TS. Nguyễn Đức Hoàng

TT Khoa học và Công nghệ Sinh học (CBB)
Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP. HCM

Email: ndhoang@hcmus.edu.vn

Đồng Nai, ngày 25 tháng 5 năm 2023

PGS.TS. NGUYỄN ĐỨC HOÀNG



1998 – 2001

CBB, Trường
ĐH KHTN, VN

1999 – 2002

PTN Công nghệ
Sinh học phân tử

2000 – 2001

Trường ĐH
Osaka và
Kyoto

2003 – 2006

2006 – 2011

06/2011 – nay

Đại học:
Trường Đại học KHTN
(1994 - 1998)



Cao học:
Trường Đại học KHTN
(1999 - 2002)

Trường ĐH
Bayreuth, CHLB Đức



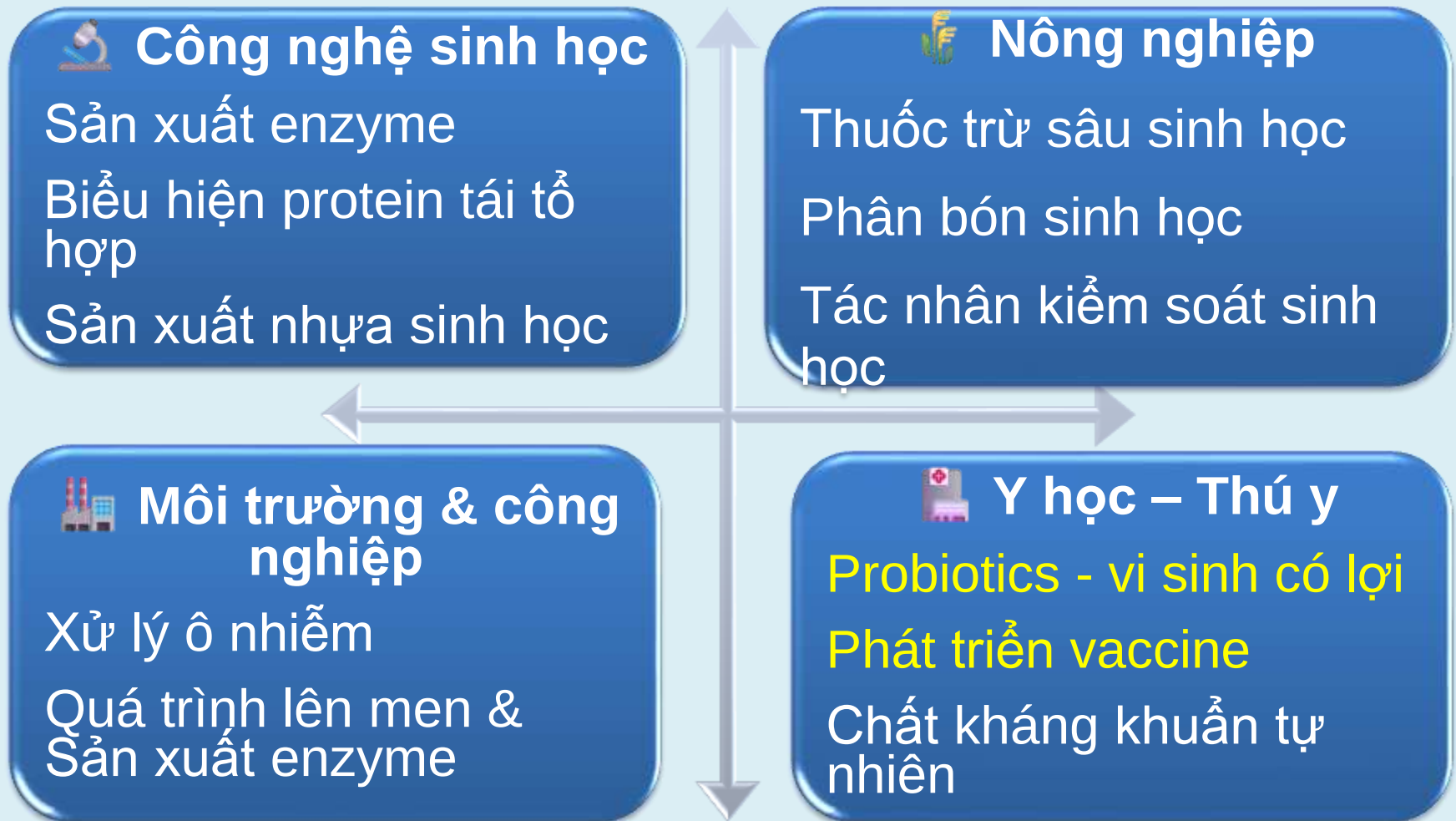
MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

Viện Max
Planck về Sinh
lý phân tử



Trường ĐH KHTN

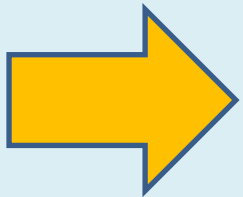
Tiềm năng ứng dụng của *Bacillus* spp.



**Nghiên cứu sử dụng *B. subtilis*
làm vector chuyển vaccine kết
hợp với probiotics**

Tại sao sử dụng *B. subtilis*?

- ❖ Là vi sinh vật an toàn, không độc
- ❖ Có thể sử dụng làm probiotics cho người và động vật
- ❖ Thân thiện với môi trường
- ❖ Có đặc điểm như một tá dược
- ❖ Chi phí sản xuất thấp



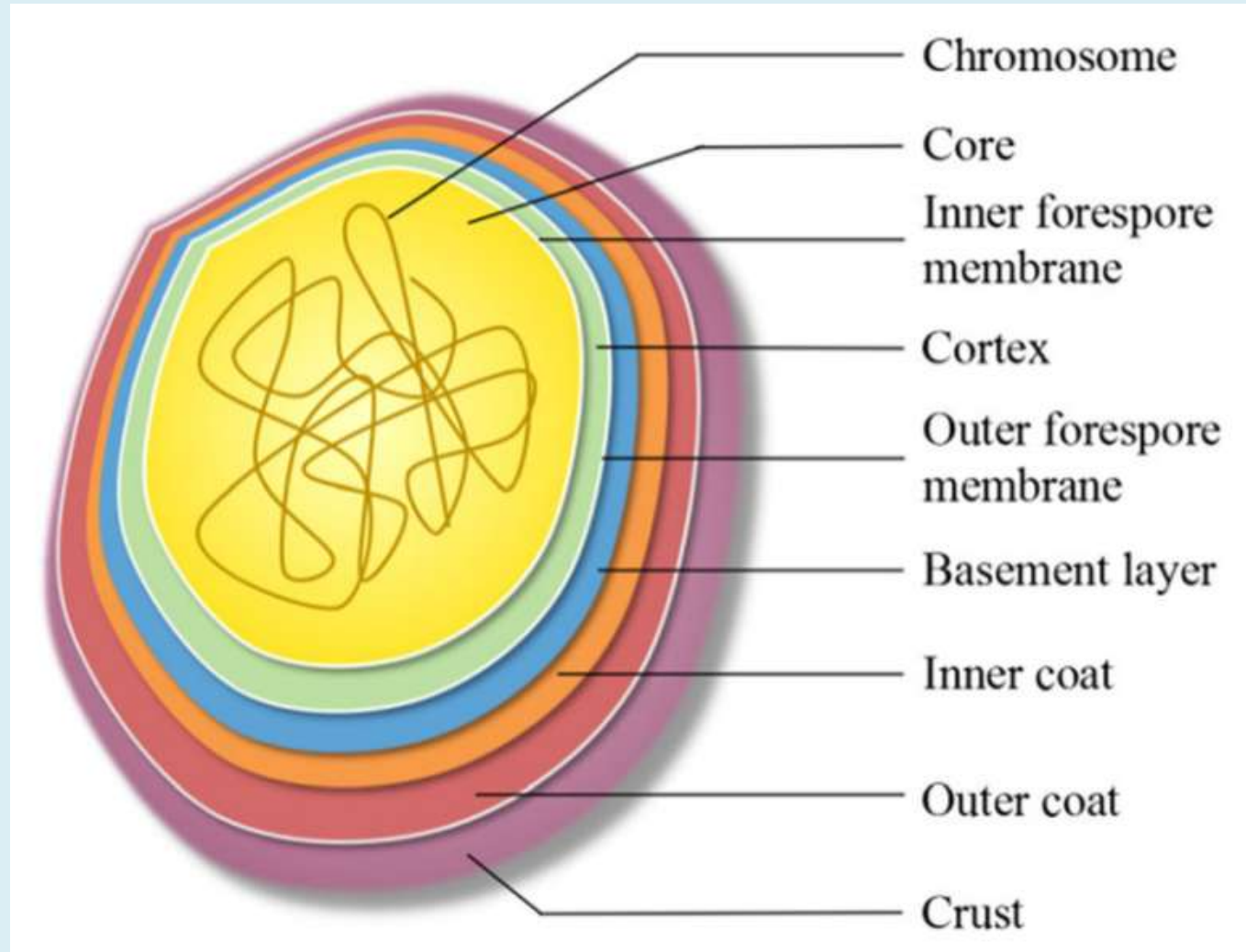
Có thể sử dụng *B. subtilis* làm vaccine uống hay ngâm

Cách sử dụng *B. subtilis* làm vector chuyển vaccine

- Sử dụng bào tử *Bacillus subtilis*
- Sử dụng tế bào sinh dưỡng: (i) biểu hiện kháng nguyên tiết, (ii) trên bề mặt, (iii) trong tế bào chất

B. subtilis gắn protein trên **bề mặt bào tử** làm vector chuyển vaccine

Có hơn 24
ngiên cứu
gắn protein
lên bề mặt
bào tử ứng
dụng làm
vaccine



Một số nghiên cứu phát triển vaccine bằng cách biểu hiện protein trên bề mặt bào tử

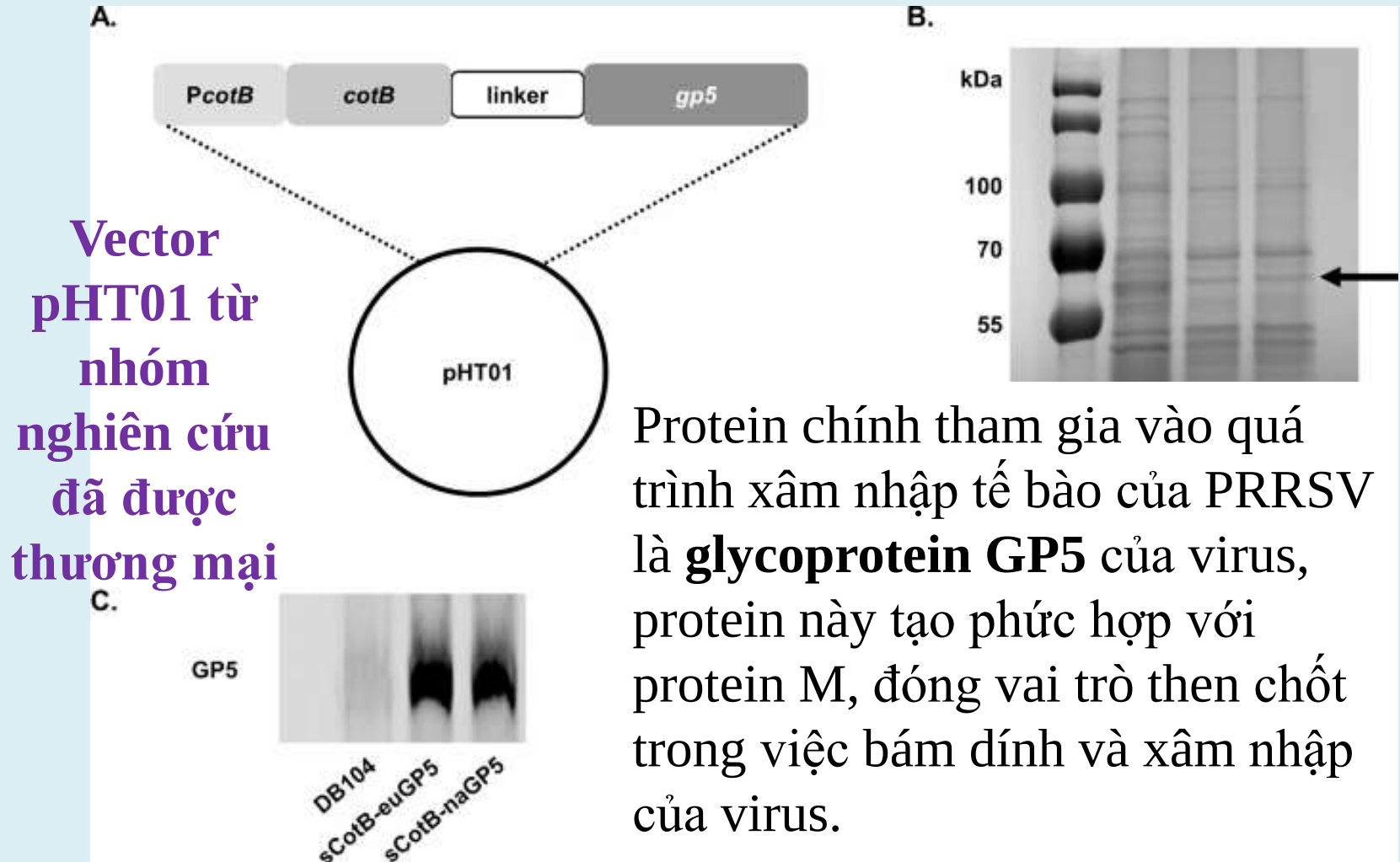
Target protein	Anchor protein	linker	Fusion method	Application
TTFC	CotB	NR	C-terminal, N-terminal, and sandwich fusions	Vaccine
Protective antigen	CotB/ CotC	NR	C-terminal	Vaccine
GST-Cpa ₂₄₇₋₃₇₀	CotB	NR	C-terminal	Vaccine
18×Histidines	CotB	NR	C-terminal	Bio-remediation
Urease A	CotB/CotC/CotG	NR	C-terminal	Whole-cell biocatalyst
Toxins A , B	CotB	NR	C-terminal	Vaccine
FliD	CotB/CotC/CotG/ CotZ	-GGGEA AAKGGG-	C-terminal	Vaccine
Envelope protein VP28	CotB	NR	C-terminal	Vaccine
VP1	CotB	NR	C-terminal	Vaccine
M2e3	CotB	NR	C-terminal	Vaccine
SlpA, InvA	CotB	NR	C-terminal	Vaccine
MPT64	CotB	NR	C-terminal	Vaccine
α-amylase, GFPuv	CotB/CotC/CotG	-GGGGS-	C-terminal	Functional enzyme
Urease B, IL-2	CotB/CotC	-GGGEA AAKGGG-	C-terminal	Vaccine

TTFC , LTB	CotC	NR	C-terminal	Vaccine
CsTP22.3	CotC	NR	C-terminal	Vaccine
SjGST	CotC	NR	C-terminal	Vaccine
Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus GP64	CotC	NR	C-terminal	Vaccine

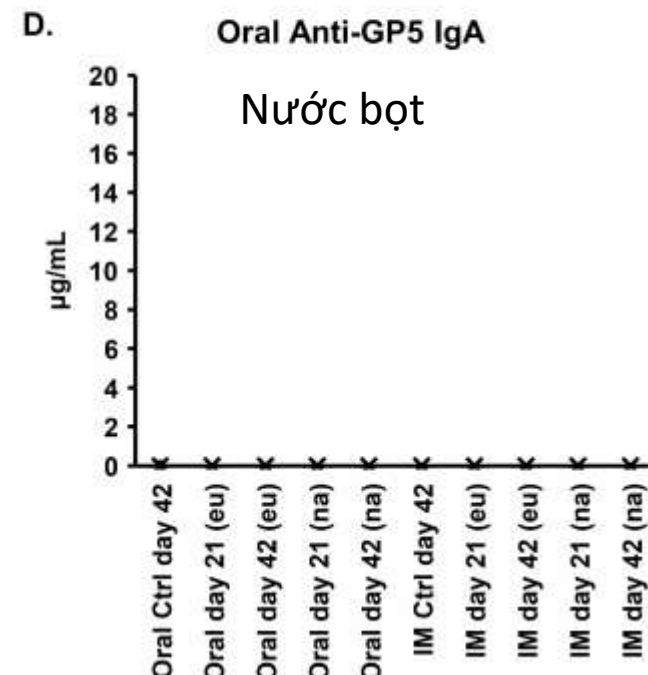
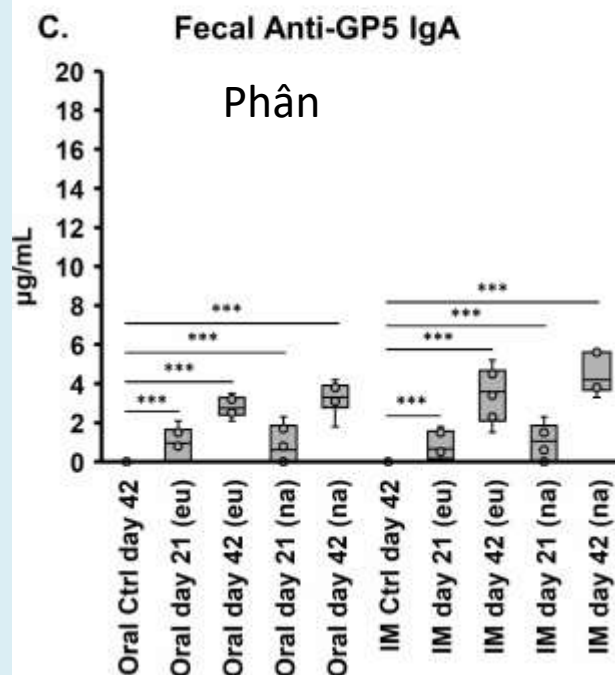
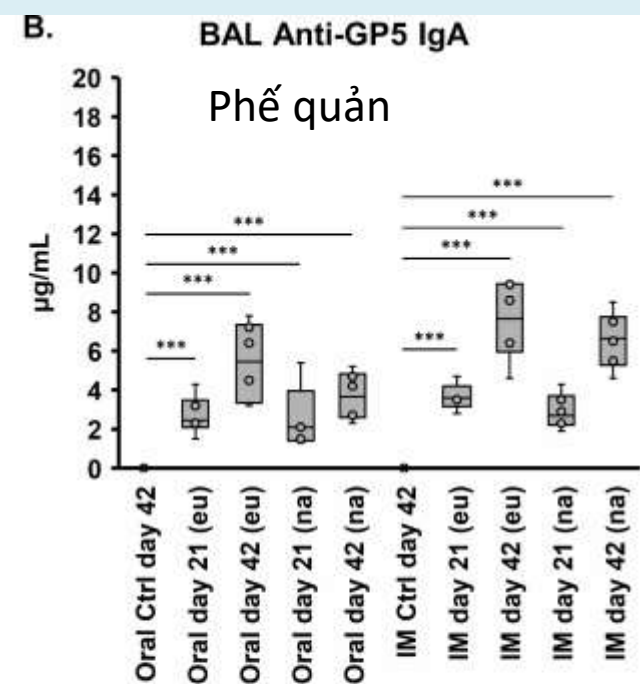
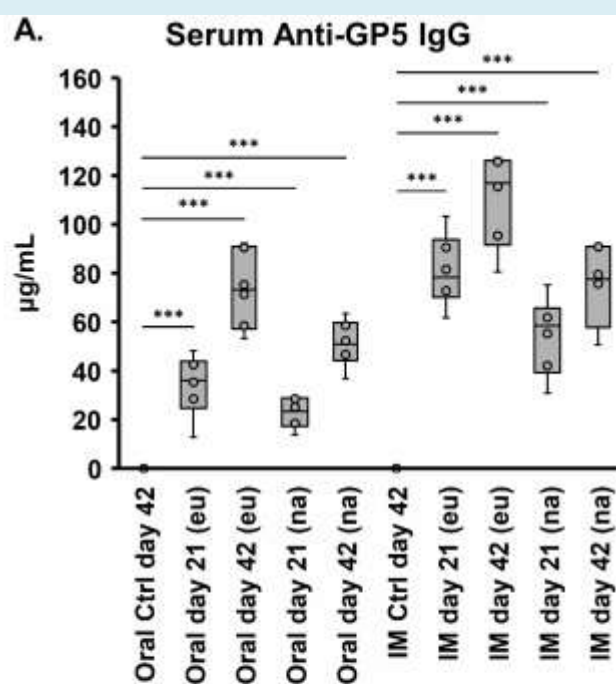
Enolase	CotC	NR	C-terminal	Vaccine
Urease B	CotC	NR	C-terminal	Vaccine
Paramyosin	CotC	NR	C-terminal	Vaccine
OmpC	CotC	NR	C-terminal	Vaccine

Urease A	CotZ/ CotB	-GGGGS-, -GGGEAA AKGGG- (only for CotB)	C-terminal	Vaccine
D- Psicose 3-Epimerase	CotZ	-GGGEA AAKGGG-	C-terminal	Whole-cell biocatalyst
Phytase, β -glucuronidase	OxdD/ CotG	-AAAAAA AAAA-	C-terminal	Animal probiotic
CagA protein	CgeA/CotB/CotC/ CotG/CotZ	-GGGGS- (for CotB, CotC,CotG), -GGGEAAA KGGG- (for CotZ, CgeA)	C-terminal, N-terminal	Vaccine

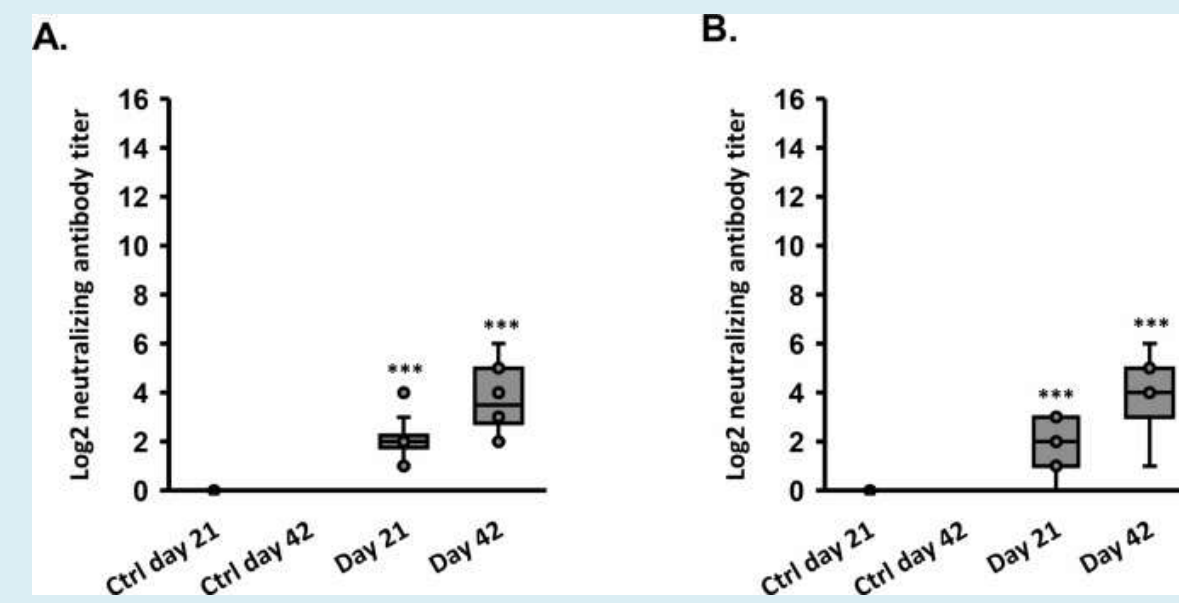
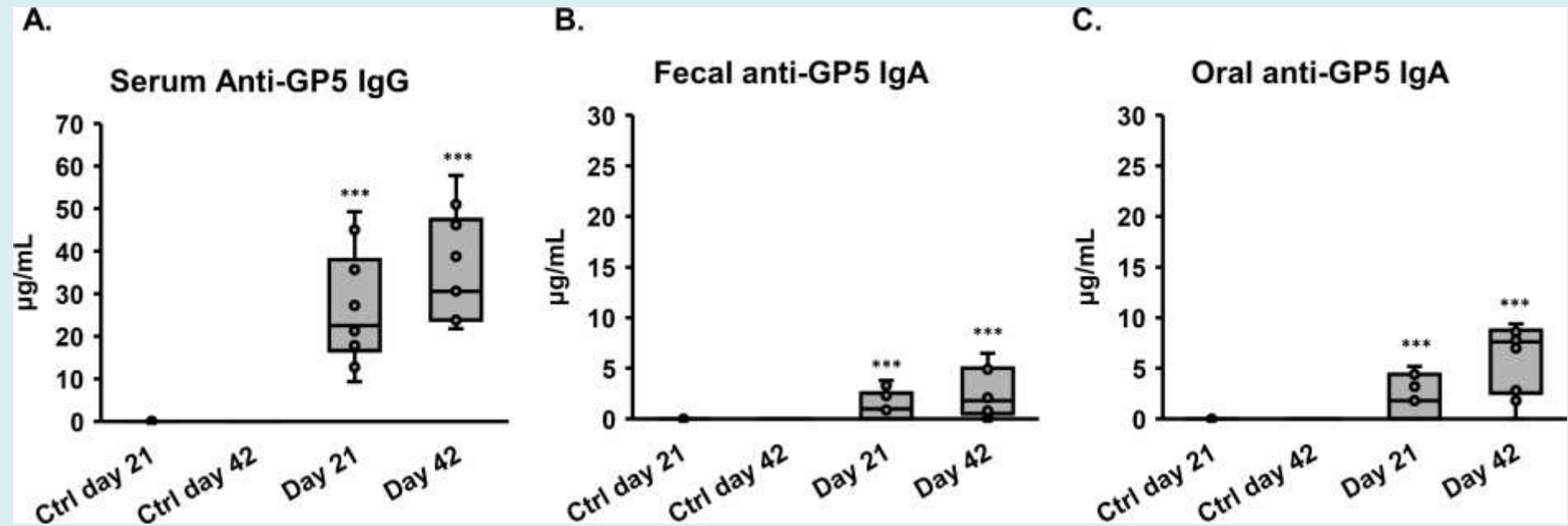
Nghiên cứu sử dụng vaccine bào tử *Bacillus subtilis* dạng uống phòng PRRS



Đáp ứng miễn dịch thử nghiệm trên chuột

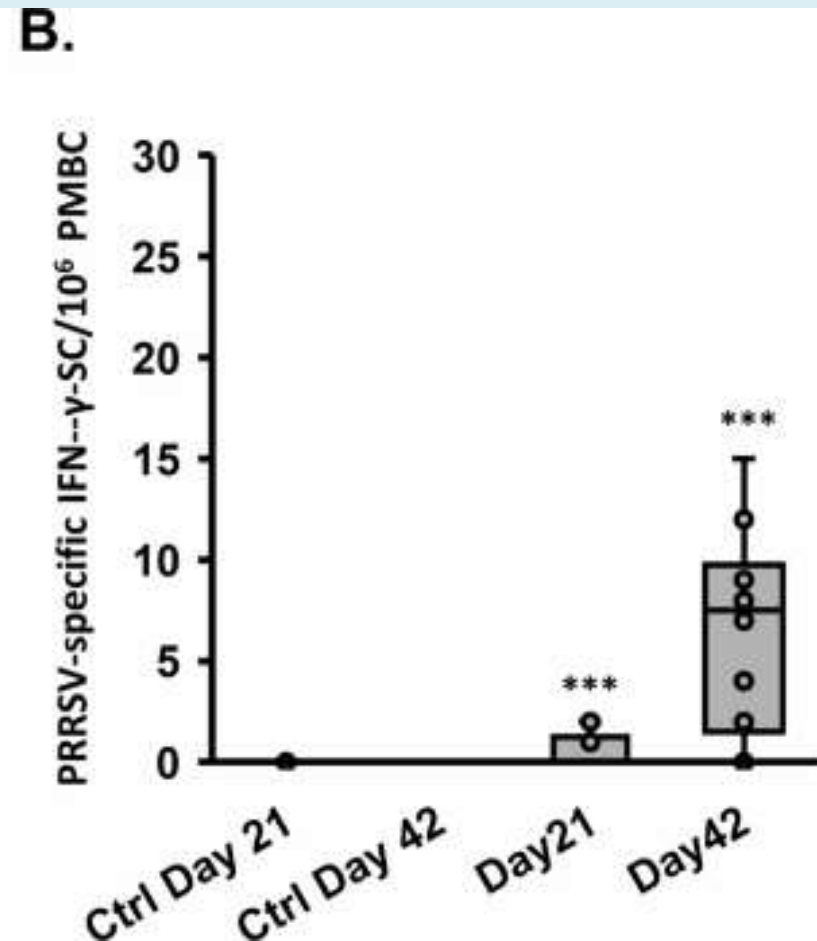
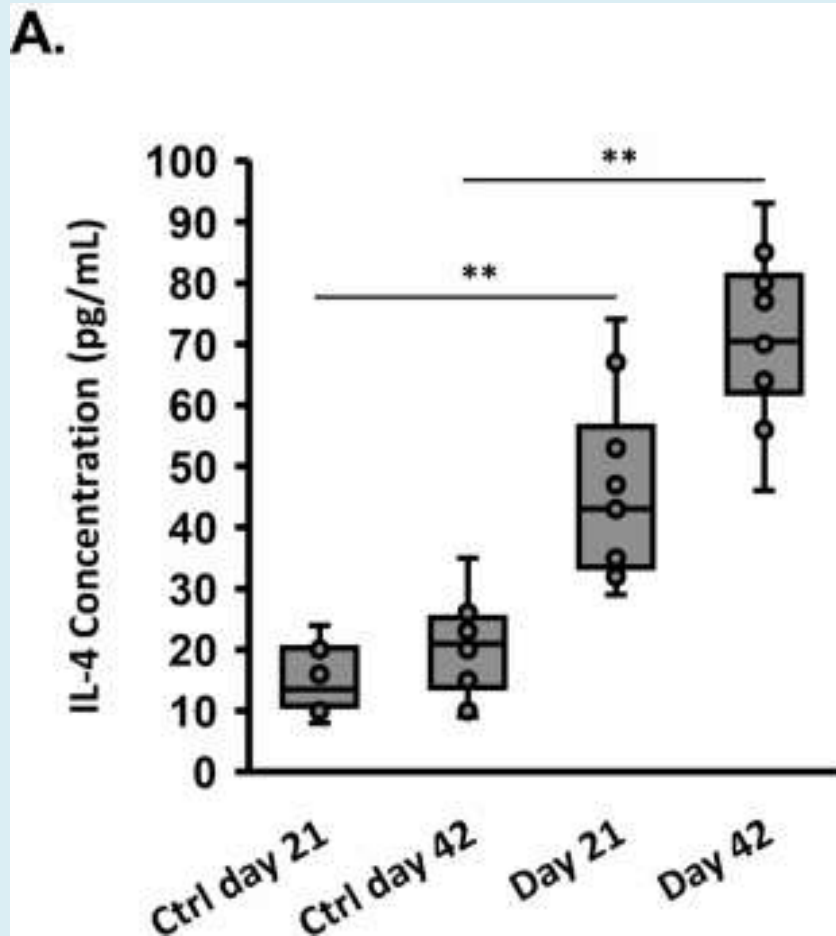


TN heo uống vaccine từ hỗn hợp bào tử *Bacillus subtilis* sCotB-euGP5 và sCotB-naGP5



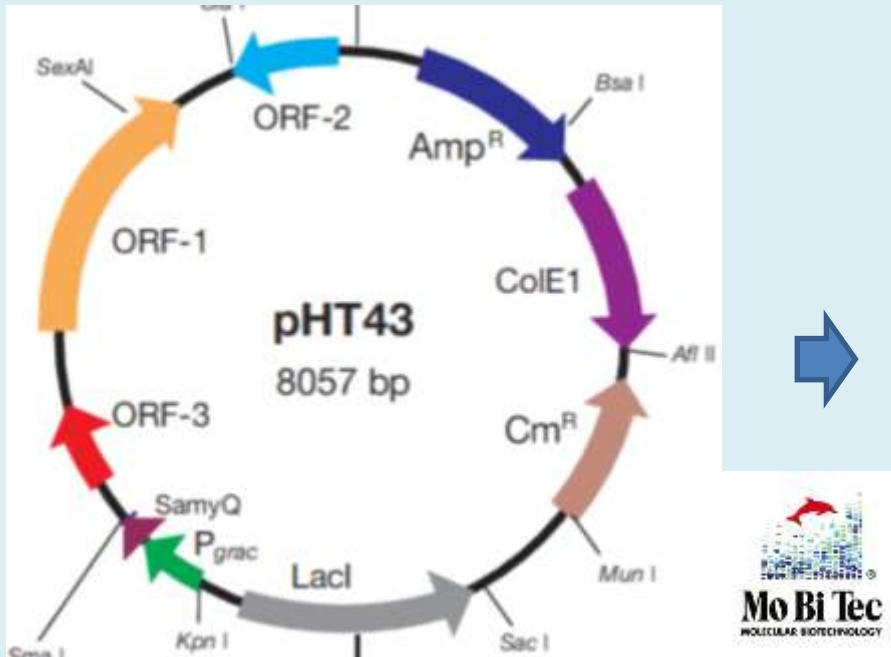
Kháng thể trung
hòa PRSSV

Sự biểu hiện của IL-4 và IFN- γ ở heo sau khi uống hỗn hợp bào tử *Bacillus subtilis* biểu hiện GP5



SỬ DỤNG TẾ BÀO SINH DƯỠNG BIỂU HIỆN KHÁNG NGUYÊN TIẾT

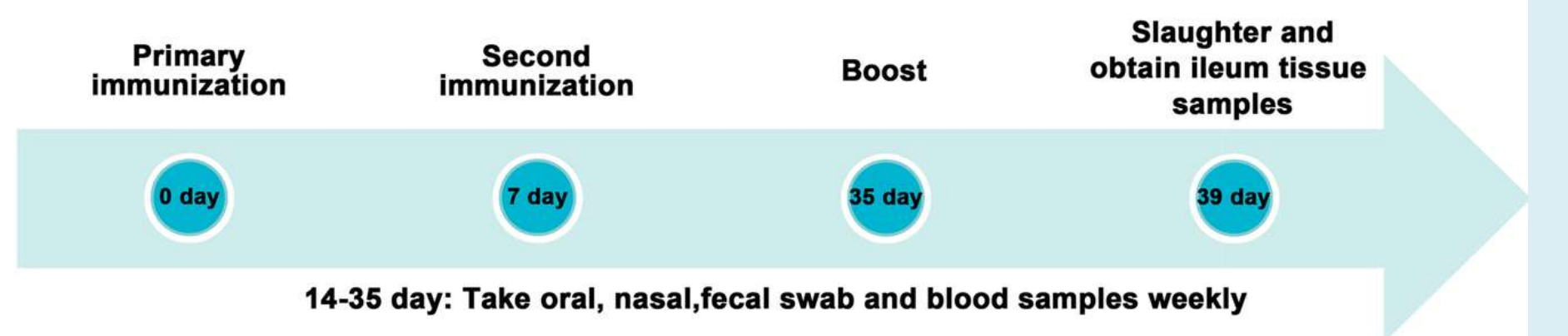
Sử dụng *B. subtilis* biểu hiện tiết protein vỏ của PCV-2



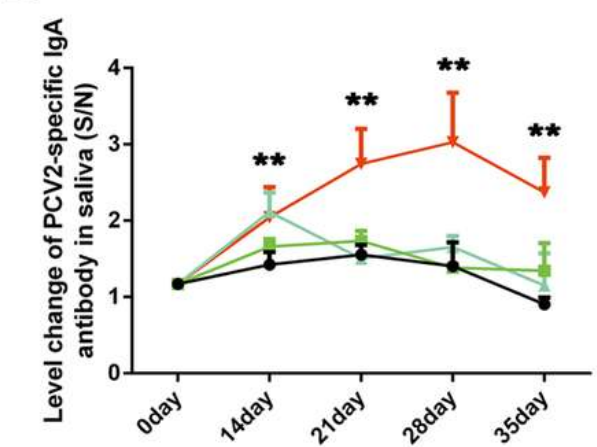
Đáp ứng
miễn dịch
tốt khi sử
dụng dạng
uống

S. Zhang, C. Mou, Y. Cao, E. Zhang, and Q. Yang, “Immune response in piglets orally immunized with recombinant *Bacillus subtilis* expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2,” *Cell Communication and Signaling*, 18(1): 23, (2020)

A

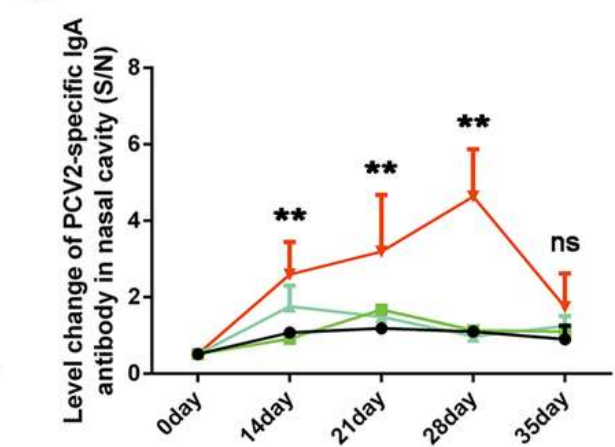


B



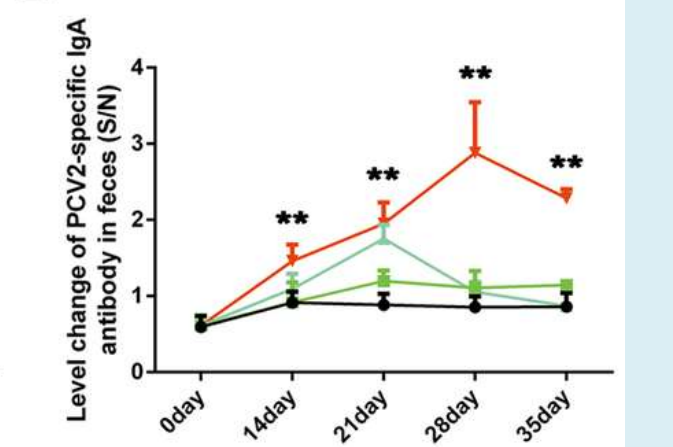
IgA trong nước bọt

C



IgA từ phết mũi

D

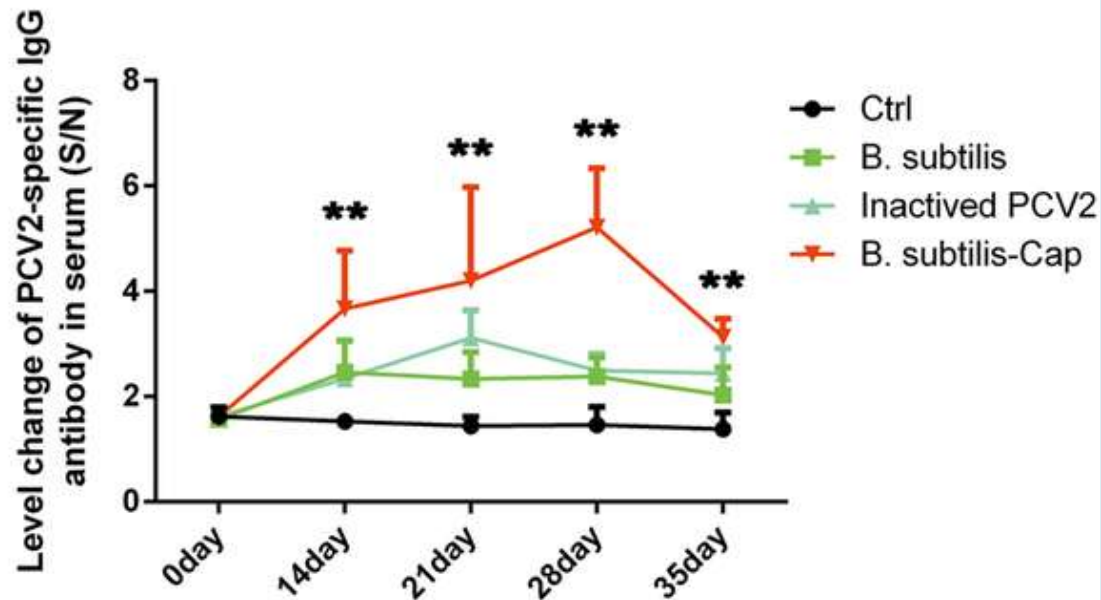


IgA từ phân

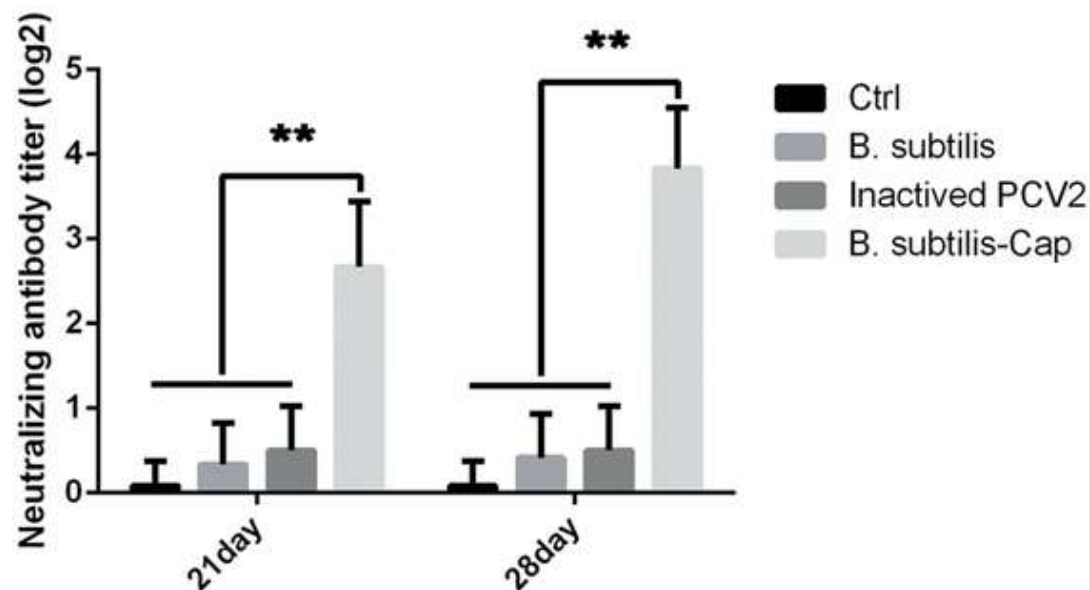
Lượng **IgG**
chuyên biệt
cho PCV-2 từ
huyết thanh

Kết quả trung
hòa hoạt tính
của huyết
thanh đối với
PCV-2

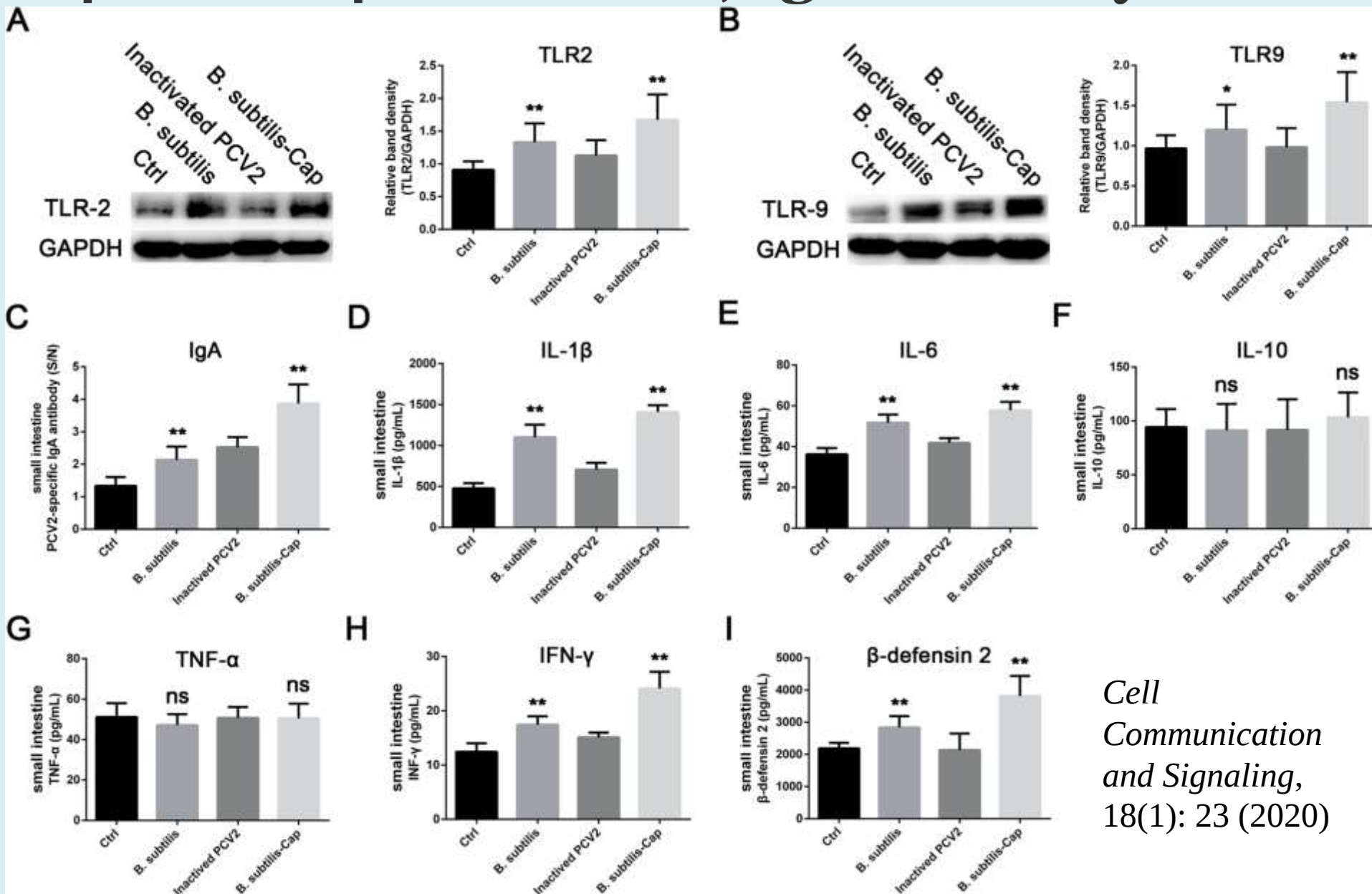
E



F

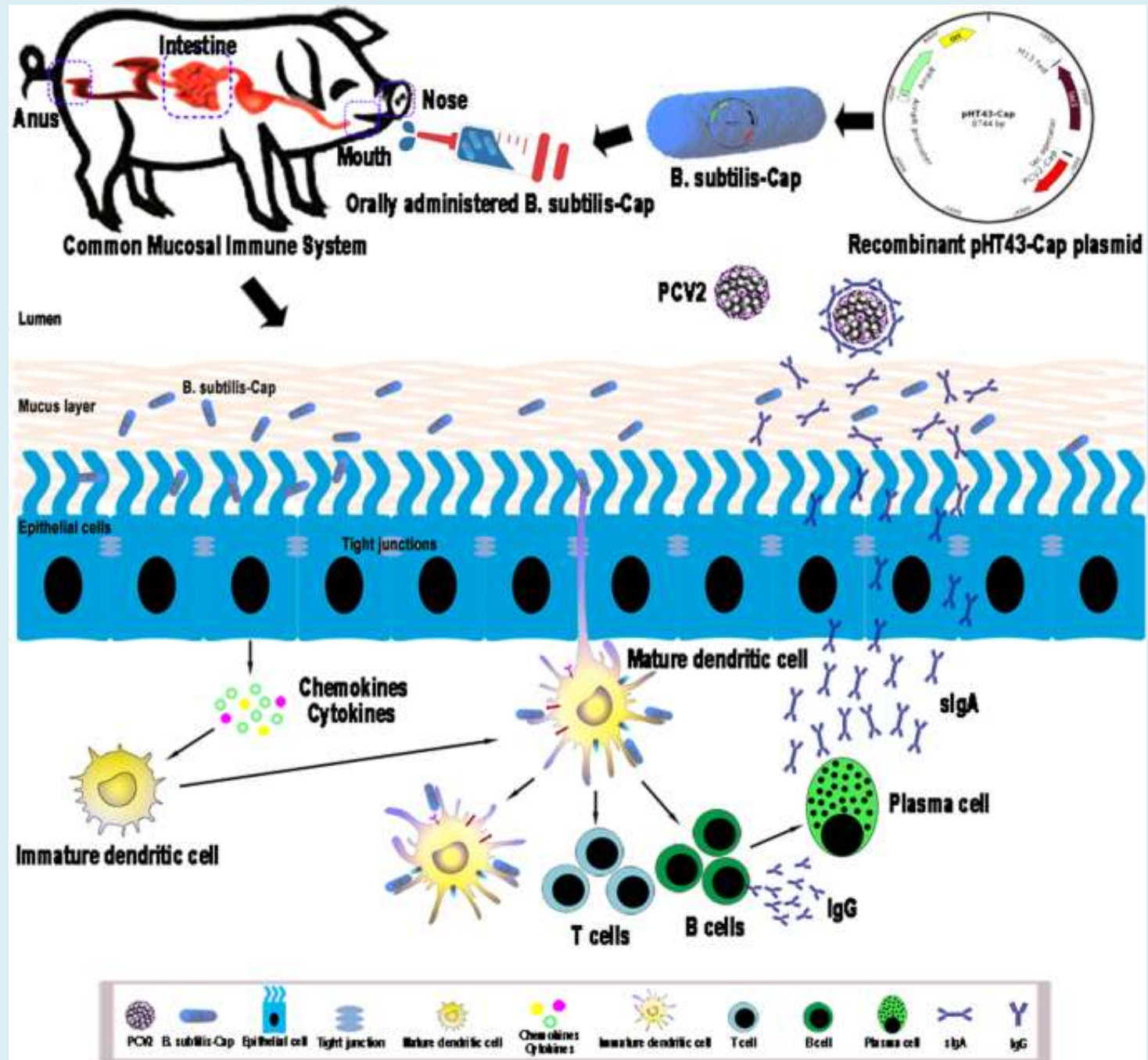


Đáp ứng miễn dịch: sự biểu hiện của TLRs, IgA và các cytokine



*Cell
Communication
and Signaling,
18(1): 23 (2020)*

Đáp ứng miễn dịch ở heo con khi được uống *B. subtilis* tái tổ hợp sử dụng protein vỏ của PCV-2



Cell
Communication
and Signaling,
18(1): 23
(2020)

Sử dụng *B. subtilis* **biểu hiện tiết** protein gai PEDV (bệnh dịch tiêu chảy cấp)

Bioscience Reports (2019) 39 BSR20182028
<https://doi.org/10.1042/BSR20182028>



Research Article

Mucosal immune responses induced by oral administration recombinant *Bacillus subtilis* expressing the COE antigen of PEDV in newborn piglets

Jialu Wang, Lulu Huang, Chunxiao Mou, En Zhang, Yongheng Wang, Yanan Cao and Qian Yang

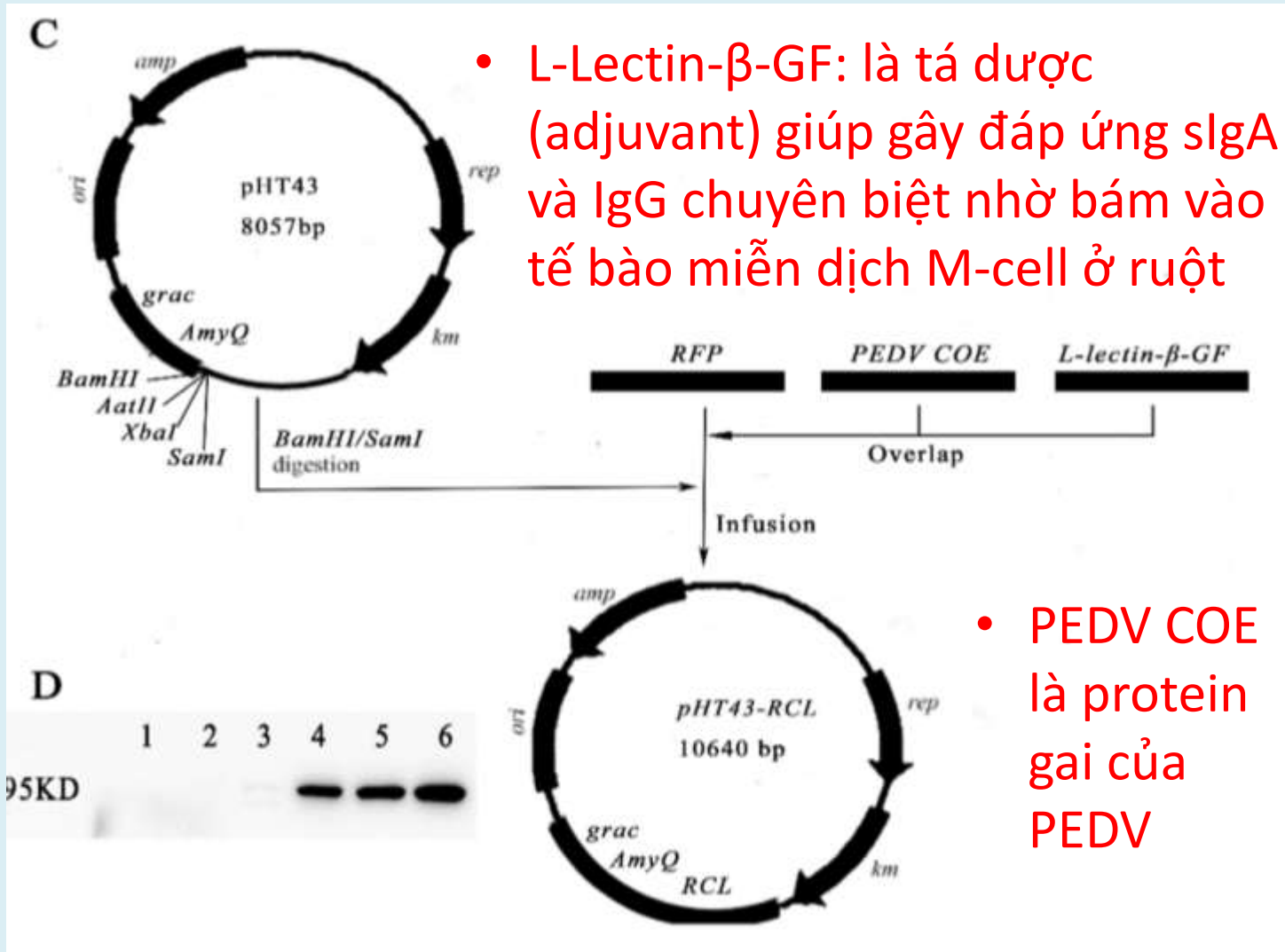


Article

Immune Responses Induced by Recombinant *Bacillus subtilis* Expressing the PEDV Spike Protein Targeted at Microfold Cells

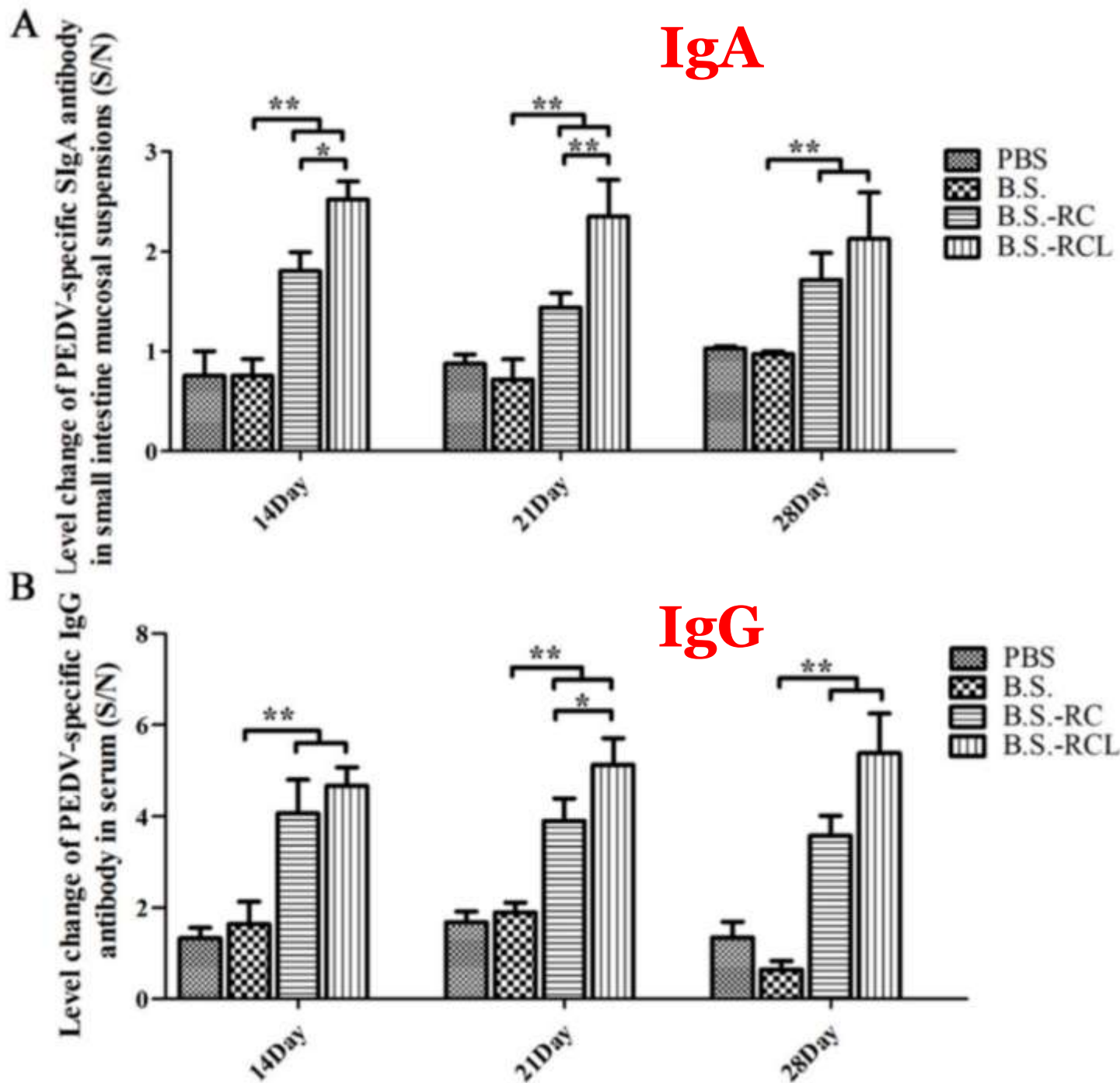
Jian Lin [†], Chunxiao Mou [†], Shuai Zhang, Liqi Zhu, Yuchen Li and Qian Yang ^{*}

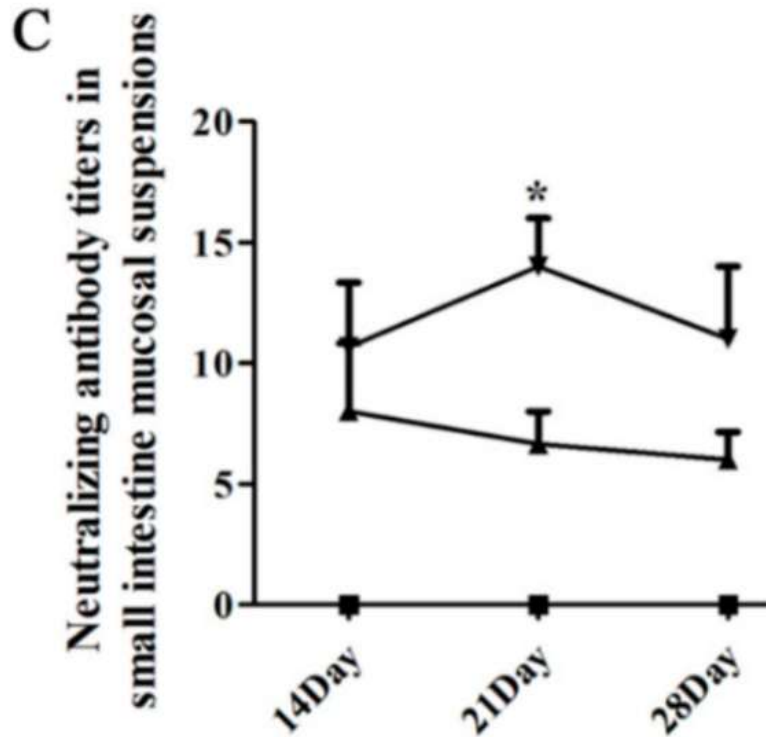
Sử dụng *B. subtilis* **biểu hiện tiết** protein gai PEDV (bệnh dịch tiêu chảy cấp)



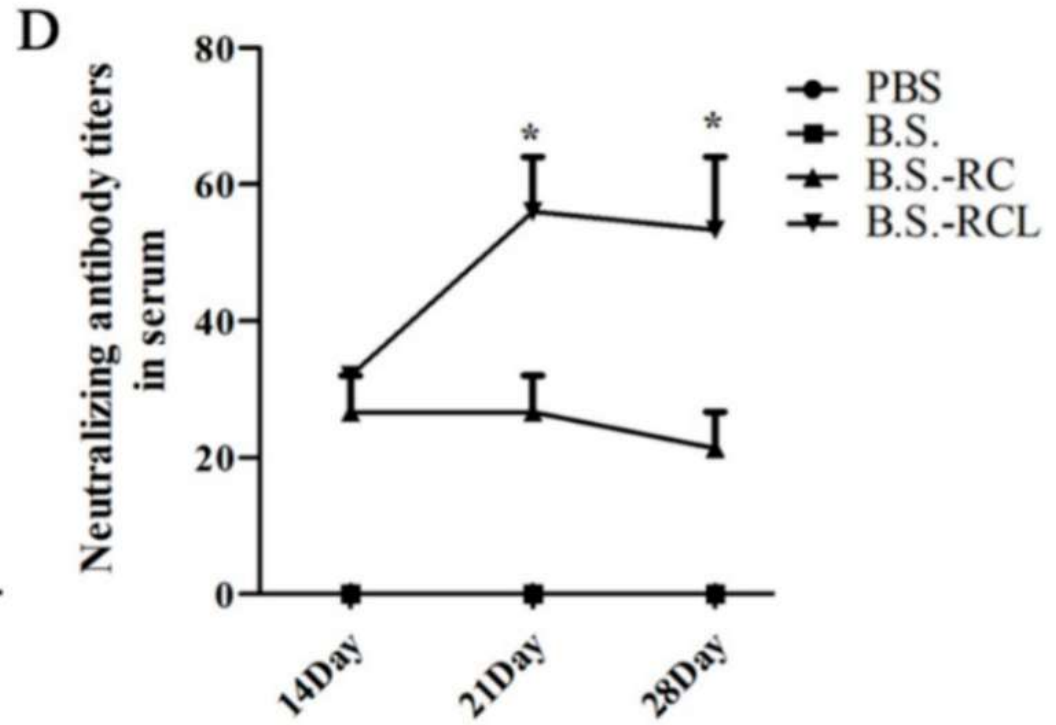
Lượng kháng thể sau khi uống *B. subtilis*

Lin et al. Vet. Sci.
9:21 (2022)
[Immune Responses
Induced by
Recombinant
Bacillus subtilis
Expressing the
PEDV Spike Protein
Targeted at
Microfold Cells]





Kháng thể trung hòa trong ruột (IgA)



Kháng thể trung hòa trong huyết thanh (IgG)

***B. subtilis* biểu hiện LTB từ *E. coli* gây đáp ứng miễn dịch và có khả năng bảo vệ khỏi độc tố**

Paccez el. al. *Vaccine* 25 (2007) 4671–4680

Brazil – CHLB Đức – Việt Nam

Thiết kế các vector cho *B. subtilis*

pLDV5



Tế bào chất

pLDV8



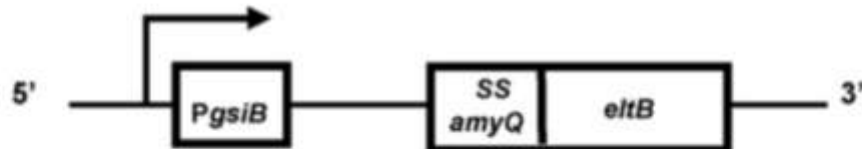
Tế bào chất

pLDV11



Tế bào chất

pLDVsecr2



Tiết

pLDVanc2

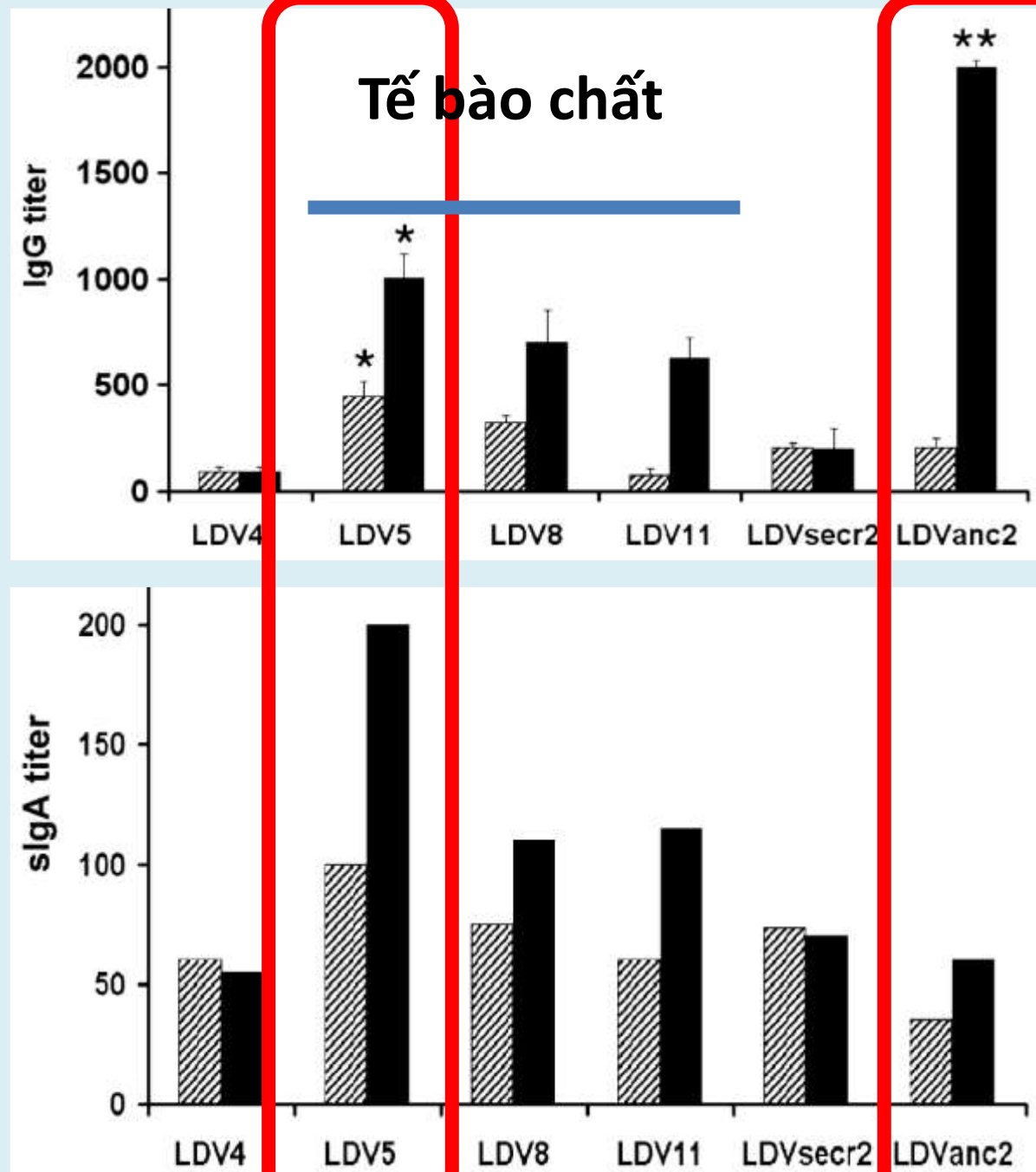


Bề mặt

Đáp ứng miễn dịch tạo IgA và IgG khi sử dụng tế bào sinh dưỡng và bào tử *B. subtilis*

“Vaccine” có khả năng bảo vệ chuột khi thử thách với liều gây chết của độc tố LT

Vaccine 25 (2007) 4671–4680



ĐỀ TÀI ĐANG THỰC HIỆN

- **Phát triển vaccine kháng *S. aureus* bắt đầu từ 2019 (được tài trợ bởi Nafosted), có thể tiếp tục phát triển phòng viêm tuyến vú trên bò**
- **Kết hợp tầm soát và phát triển vaccine phòng *Klebsiella pneumoniae* từ 2025 (Nafosted và UKRI)**
- **Nghiên cứu phát triển vaccine cho cá tra phòng *Aeromonas* spp. và *Edwardsiella ictaluri***

Từ nghiên cứu phát triển hệ thống biểu hiện cho *Bacillus subtilis* đến ứng dụng

NC CƠ BẢN

LOẠI KHUNG VECTOR:

- Plasmid tồn tại độc lập
- Vector sáp nhập vào bộ gen

Kiểu BIỂU HIỆN PROTEIN:

- Cảm ứng và không sử dụng chất cảm ứng
- Có sẵn thư viện promoter

Vị trí BIỂU HIỆN PROTEIN:

- Gắn trên bề mặt tế bào
- Gắn trên bề mặt bào tử
- Biểu hiện trong tế bào chất
- Biểu hiện tiết vào môi trường

NC ỨNG DỤNG

Sản xuất protein tái tổ hợp trong tế bào chất

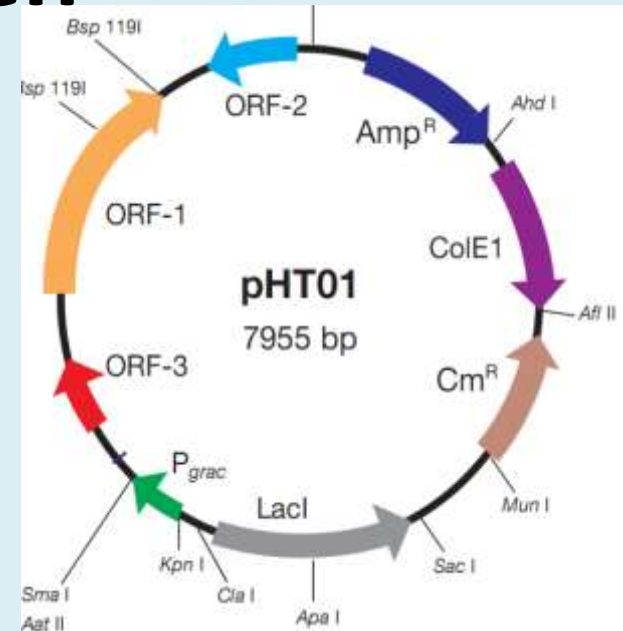
Nghiên cứu phát triển vaccine cho cá tra

NCPT vaccine phòng độc tố LT của *E. coli*

NCPT vaccine phòng *Staphylococcus aureus*

Các vector đã được thương mại do nhóm phát triển

- ❖ Hệ thống biểu hiện cho *B. subtilis*
 - Trong tế bào chất
 - Trong môi trường
 - Trên bề mặt tế bào
 - Trên bề mặt bào tử
- ❖ Plasmid thương mại cho *B. subtilis* được thương mại đầu tiên (MoBiTec, 2007)
https://www.mobitec.com/cms/products/bio/04_vector_sys/bacillus_subtilis_expression.html
- ❖ Hệ thống biểu hiện *Pgrac100* được phân phối bởi MoBiTec từ năm 2013
https://www.mobitec.com/cms/products/bio/04_vector_sys/b_subtilis_pgrac100.html
- ❖ Hệ thống sản xuất protein không cần sử dụng chất cảm ứng từ 2018



- [1] 2005 *Plasmid* 54: 241
- [2] 2006 *J. Biotechnol.* 122: 473
- [3] 2006 *Protein Expr. Purif.* 46: 189
- [4] 2007 *Curr. Microbiol.* 55: 89
- [5] 2007 *J. Biotechnol.* 128: 486
- [6] 2010 *Protein Expr. Purif.* 71: 174
- [7] 2011 *AMB Express* 1: 22
- [8] 2011 *J. Biotechnol.* 157: 167
- [9] 2013 *J. Biotechnol.* 168: 32
- [10] 2015 *Mic. Cell Fac.* 14:72
- [11] 2017 *Mic. Cell Fac.* 16: 130
- [12] 2020 *Biotech. Reports* 28: e00540

Nhóm nghiên cứu có đủ nguồn nhân lực mạnh, hiểu sâu về phát triển vector và biểu hiện protein tái tổ hợp ở *B. subtilis*

Nhóm đã bước vào nghiên cứu phát triển vaccine sử dụng *B. subtilis* là vector từ 2019

HỢP TÁC nghiên cứu phát triển vaccine uống và nhỏ mũi, kết hợp probiotics sử dụng Công nghệ sinh học *B. subtilis*

Hợp tác nghiên cứu với các mảng chính của nhóm

Công nghệ sinh học
phân tử: sử dụng *B.
subtilis* làm vector
chuyển vaccine kết
hợp probiotics

Công nghệ vi
sinh: nghiên cứu
và ứng dụng
Bacillus spp.

Nghiên cứu phát
triển chẩn đoán
phân tử



Xin cảm ơn!

