

PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ HOÀN CHỈNH cDNA MÃ HÓA HEMOCYANIN LIÊN QUAN ĐẾN ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH Ở TÔM SÚ (*PENAEUS MONODON*)

Hoàng Thị Thu Yến¹, Kim Thị Phương Oanh², Phạm Anh Tuấn¹, Nông Văn Hải²

¹Dại học Thái nguyên

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Tổng cục Thủy sản, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn

TÓM TẮT

Hemocyanin là một loại protein ngoại bào chứa đồng tồn tại ở trong máu của động vật thân mềm và chân khớp. Đầu tiên, hemocyanin được biết là protein vận chuyển oxy phân tử trong máu. Đến nay, protein này được chứng minh có nhiều chức năng, đặc biệt là các chức năng liên quan đến miễn dịch kháng nấm, kháng khuẩn và virus. Một phần cDNA hemocyanin ở tôm sú đã được công bố trên GenBank mã số AF431737 có kích thước 1470 bp gồm cả mã kết thúc và một đoạn ngắn 3'-UTR. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập gen *hemocyanin* hoàn chỉnh dựa trên một phần thông tin đã biết này. Bằng kỹ thuật 5'RACE (5' Rapid Amplification of cDNA Ends) chúng tôi đã phân lập và xác định trình tự đoạn gen kéo dài về phía đầu 5' gồm cả mã mở đầu và một đoạn ngắn 5'-UTR. Từ kết quả 5'RACE và trình tự AF431737, đoạn ORF hoàn chỉnh của gen *hemocyanin* được phân lập bằng kỹ thuật RT-PCR và xác định trình tự. Trình tự đầy đủ của gen *hemocyanin* có kích thước 2052 bp, mã hóa 683 amino acid. Hemocyanin được dự đoán có 3 domain và 6 vị trí amino acid histidine quyết định cấu trúc và chức năng của phân tử protein. Khi so sánh trình tự gen *hemocyanin* mới xác định với một phần trình tự đã công bố trước (AF431737), chúng tôi thấy có sai khác ở 33 vị trí nucleotide. Sự sai khác trình tự nucleotide này dẫn đến sự sai khác trình tự amino acid ở 7 vị trí 242H→D, 304N→D, 360V→L, 443K→L, 453Y→F, 472A→P và 576G→A. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi góp phần vào việc nghiên cứu chức năng của hemocyanin và những gen/protein liên quan đến khả năng miễn dịch của tôm sú.

Từ khóa: protein vận chuyển oxy, gen liên quan đến miễn dịch, *Penaeus monodon*, hemocyanin, tôm sú

MỞ ĐẦU

Sản xuất tôm là hoạt động kinh tế quan trọng đối với các nước đang phát triển. Việc phát triển nghề nuôi tôm qua nhiều thập kỷ gần đây luôn đi cùng với sự phát hiện của các bệnh dịch do virus, vi khuẩn và một số trường hợp do vi nấm (Destoumieux *et al.*, 1999; Lightner, Redman 1998; Lightner 1983). Các loài vi khuẩn thuộc chi *Vibrio* là những tác nhân gây bệnh vi khuẩn chủ yếu và có thể gây tử vong cao như: bệnh phát sáng trên tôm sú (*V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*), bệnh hoại tử vỏ phân và ăn mòn vỏ kitin (*V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. aguilarrum*). Ở tôm nuôi có khoảng 20 loại virus gây bệnh, trong đó virus gây hội chứng đốm trắng (White Spots Syndrome Virus - WSSV) là nguồn bệnh gây ra tỉ lệ tử vong cao trong thời gian ngắn, đã gây nên sự thiệt hại lớn nhất về kinh tế cho tôm nuôi trong thập kỷ gần đây (Zhang *et al.*, 2002). Do đó, hiểu biết rõ hơn về đáp ứng miễn dịch của tôm chống lại các vi sinh vật xâm nhiễm sẽ giúp đưa ra các giải pháp điều khiển bệnh hiệu quả để nhằm mục đích phát triển ổn định lâu dài nghề nuôi tôm

trên thế giới. Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu nhưng cho đến nay, việc kiểm soát bệnh virus ở tôm vẫn còn là thử thách lớn đối với ngành thủy sản (Shekhar, Lu, 2009).

Tôm giống như các động vật không xương khác không có hệ đáp ứng miễn dịch thích ứng thực sự (Hoffmann *et al.*, 1999). Tuy nhiên, do tôm sống trong môi trường nước giàu các vi sinh vật nên đã phát triển hệ thống bảo vệ cơ thể hiệu quả. Bước đầu tiên và cần thiết của quá trình này là sự nhận biết các vi sinh vật xâm nhiễm (Vargas-Albores, Yepiz-Plascencia, 2000) tiếp theo đó là miễn dịch thụ động loại bỏ chúng ra khỏi cơ thể, hệ thống này được gọi là miễn dịch tự nhiên. Hệ miễn dịch tự nhiên chia ra làm hai hệ thống bảo vệ chính: miễn dịch tế bào (cellular barriers) và miễn dịch thể dịch (Humoral barriers). Miễn dịch tế bào bao gồm hệ thống thực bào (phagocytosis), apoptosis, tạo khối u bao bọc vật thể lạ xâm nhập (encapsulation) và sau đó được phá hủy thông qua hệ thống hoạt hóa Phenoloxidase (proPO activating system). Miễn dịch thể dịch bao gồm các hệ thống: bổ thể (complement

system), đông máu (hemolymph coagulation system), yếu tố dính kết tế bào (agglutinin-lectin system) và quá trình tổng hợp các loại peptide kháng khuẩn, kháng nấm và kháng virus (Iwanaga, Lee, 2005; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009; Tassanakajon *et al.*, 2010).

Hemocyanin là một loại protein lớn chứa đồng, có ở máu của động vật chân khớp và thân mềm (Voit, Feldmaier-Fuchs, 1990). Hemocyanin được xác định ở trong máu của tất cả taxa chân khớp (Hagner-Holler *et al.*, 2004; Kusche, Burmester 2001; Kusche *et al.*, 2002; Pick *et al.*, 2009). Trong lớp giáp xác (Crustacea) hemocyanin ở một số phân lớp chỉ có vai trò vận chuyển oxy, các hemocyanin của phân lớp Malacostraca được nghiên cứu nhiều về cấu trúc và chức năng (Mangum, 1985; Markl, Decker, 1992). Hemocyanin của phân lớp Malacostraca luôn hình thành cấu trúc dạng hexamer hoặc dodecamer, mặc dầu cấu trúc 4x6 đã được công bố (Markl, Decker, 1992; Markl *et al.*, 1986; Miller *et al.*, 1977). Trong phân lớp này các hemocyanin được phân loại thành 3 loại khác biệt bằng phương pháp miễn dịch là alpha, beta và gamma (Markl *et al.*, 1986). Phân tử hemocyanin gồm 630-660 amino acid, với khối lượng phân tử dao động khoảng 75 kDa. Mỗi phân tử thường có chứa 3 domain (Gaykema *et al.*, 1984, Markl, Decker 1992; Volbeda, Hol, 1989). Domain thứ nhất đầu N (~150-180 amino acid) cần thiết cho sự hình thành xoắn α . Domain thứ 2 (~220 amino acid) bao gồm các vị trí bám của đồng (Cu) là CuA và CuB. Sự vận chuyển 1 phân tử oxy được trợ giúp bởi 2 ion Cu, mỗi phân tử Cu liên kết với 3 amino acid histidin tương ứng trong các vị trí ở domain 2. Domain thứ 3 có chứa nếp gấp beta (~260 amino acid) quy định sự hình thành nên cấu trúc bậc 2.

Đầu tiên hemocyanin được biết đến là một protein vận chuyển oxy. Sau đó, nó được chứng minh là một loại protein đa chức năng liên quan đến các quá trình sinh lý như dự trữ protein, điều khiển thẩm thấu, chu kỳ lột xác và sự hình thành bộ xương ngoài (Adachi *et al.*, 2005; Jaenicke *et al.*, 1999; Paul, Pirow, 1998). Đến nay, phân tử hemocyanin và các peptide bắt nguồn từ trình tự amino acid đầu C của hemocyanin đã được chứng minh có chức năng kháng khuẩn và kháng nấm (Decker, Jaenicke 2004; Decker, Rimke, 1998; Decker *et al.*, 2001; Destoumieux-Garzon *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2003; Nagai, Kawabata, 2000; Nagai *et al.*, 2001). Nhiều gen mã hóa các tiểu phân của hemocyanin đã được tạo dòng và xác định trình tự ở

lớp giáp xác Crustacea. Ở tôm càng xanh (*Marsupenaeus japonicus*) có 2 tiểu phân hemocyanin (Lei *et al.*, 2008), tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) có 2 tiểu phân (Sellos *et al.*, 1997), tôm Trung Quốc (*Fenneropenaeus chinensis*) có 1 tiểu phân (FJ594414), tôm sú *Penaeus monodon* có 1 tiểu phân (AF431737), tôm *Odontodactylus scyllarus* có 4 tiểu phân (Scherbaum *et al.*, 2010). Hai tiểu phân hemocyanin (AF43173) ở tôm càng xanh (Mj1HcL và Mj1HcY) có sự biểu hiện khác nhau ở mức độ phiên mã khi tôm nhiễm WSSV, tiểu phân Mj1HcL tăng đáng kể ở nhóm tôm nhiễm WSSV (Lei *et al.*, 2008). Năm 2006, Zhang và đồng tác giả chỉ ra hemocyanin của tôm thẻ có thể tương tác với 8 loài vi khuẩn gây bệnh ở tôm (Zhang *et al.*, 2006). Cùng nhóm nghiên cứu này đã chứng minh hemocyanin có hoạt tính phân giải hồng cầu (Zhang *et al.*, 2009). Hemocyanin được tách chiết ở tôm sú và cho thấy khả năng kháng nhiều loại virus bao gồm cả virus RNA và DNA. Tuy nhiên cơ chế kháng vẫn chưa được sáng tỏ (Zhang *et al.*, 2004).

Năm 2003, một đoạn gen *hemocyanin* không hoàn chỉnh đã được phân lập ở tôm sú có chiều dài 1470 bp (mã số GenBank AF431737), mã hóa 499 amino acid đầu C và một mã kết thúc TAG. Do đó, để góp phần nghiên cứu vai trò các gen liên quan đến khả năng miễn dịch của tôm sú, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tạo dòng và xác định trình tự gen *hemocyanin* hoàn chỉnh trên đối tượng tôm sú Việt Nam dựa trên thông tin một đoạn gen đã công bố trên GenBank nhằm phục vụ cho nghiên cứu biểu hiện và chức năng.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chúng tôi đã tiến hành thu thập mẫu tôm bị bệnh đốm trắng tại Trạm Nghiên cứu thủy sản nước lợ, km10 cao tốc Hải Phòng - Đồ Sơn và đầm nuôi tư nhân vùng lân cận. Ngay sau khi nhận tôm nguyên con, mô gan đã được tách riêng và bảo quản trong dung dịch nitơ lỏng.

Phương pháp

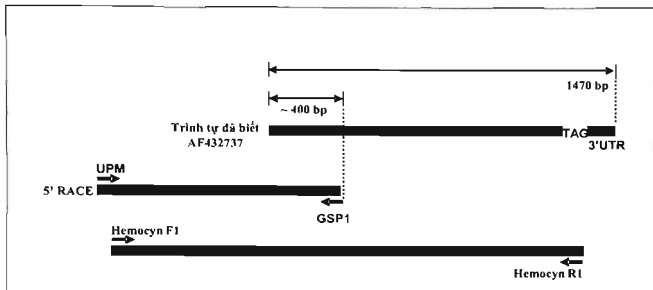
Tách chiết RNA tổng số, tinh sạch mRNA và tổng hợp cDNA

Phương pháp tách chiết RNA tổng số, tinh sạch mRNA và tổng hợp cDNA được thực theo mô tả của Hoàng Thị Thu Yến và đồng tác giả (Hoàng Thị Thu Yến *et al.*, 2010).

Nhân gen bằng kỹ thuật 5'RACE và RT-PCR

Dựa trên thông tin một đoạn gen *hemocyanin* đã công bố trên GenBank (mã số AF431737), chúng tôi thiết kế mỗi đặc hiệu GSP1 (Hình 1, Bảng 1). Mỗi

đặc hiệu này kết hợp với mỗi UPM (Universal Primer A Mix), cung cấp bởi kit "SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit" (Invitrogen) để nhân đoạn gen *hemocyanin* kéo dài về phía đầu 5' (gọi tắt là: đoạn 5'-*hemocyanin*).



Hình 1. Sơ đồ thiết kế mỗi.

Bảng 1. Danh sách và trình tự các mồi được sử dụng trong nghiên cứu.

Stt	Tên mồi	Trình tự nucleotide (5'-3')	Gen đích	Kích thước ước tính
1	GSP1	CCATGTGGATCACTCTGTCGAC	5'-hemocyanin	> 400 bp
2	Hemocyn F1	ATGGGGACCGTCAACATGAAGTCTTG	Hemocyanin ORF đầy đủ	~ 2,0 kb
3	Hemocyn R1	CTAATCATGTTGGATATATTCGCCATG		

Phản ứng 5'RACE được thực hiện bằng enzyme Dream *Taq* DNA Polymerase (Fermentas) với chu trình nhiệt như sau: 94°C -3 phút; (94°C -1 phút; 55°C -1 phút; 72°C -1 phút) x 30 chu kỳ; 72°, 10 phút; kết thúc và giữ ở 4°C.

Sau khi tách dòng và đọc trình tự của đoạn 5'-*hemocyanin*, trình tự đầy đủ của gen *hemocyanin* sẽ được xác định bằng cách ghép với thông tin đã biết AF431737. Dựa trên kết quả phân tích lý thuyết này, chúng tôi thiết kế cặp mồi đặc hiệu Hemocyn F1 và Hemocyn R1 để phân lập gen *hemocyanin* hoàn chỉnh từ mẫu tôm sú Việt Nam (Hình 1, Bảng 1).

Phản ứng RT-PCR được thực hiện bằng enzyme Dream *Taq* DNA Polymerase (Fermentas) với chu trình nhiệt như sau: 95°C/3 phút; (95°C/1 phút; 55°C/45 giây; 72°C/1 phút 30 giây) x 30 chu kỳ;

72°/10 phút; kết thúc và giữ ở 4°C.

Tách dòng gen

Phương pháp tách dòng các đoạn 5'-*hemocyanin* và gen *hemocyanin* đầy đủ được thực theo mô tả của Hoàng Thị Thu Yến và đồng tác giả (Hoàng Thị Thu Yến *et al.*, 2010).

Xác định trình tự gen

Trình tự nucleotide của các gen được xác định trên máy ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Gen *hemocyanin* được phân lập và xác định trình tự từ mẫu mô gan của 1 cá thể tôm sú bị nhiễm bệnh đốm trắng. Trình tự được đọc ở 3 dòng plasmid tái tổ hợp, ở mỗi dòng đọc lặp lại 2 lần xuôi ngược và 2 mỗi năm trong gen. Kết quả trình tự gen được phân tích, so sánh bằng

phần mềm sinh học chuyên dụng (Sequence Scanner, BLAST, Bioedit, GenDoc).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

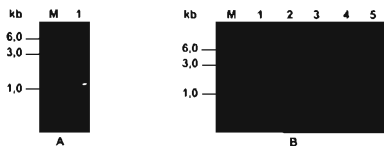
Phân lập đoạn 5'-*hemocyanin*

Mẫu mRNA tách chiết và tinh sạch từ mô gan của tôm sú bị bệnh đốm trắng được dùng làm khuôn tổng hợp sợi cDNA thứ nhất bằng cách sử dụng mỗi 5'-RACE CDS A, SMARTer II A Oligonucleotide và enzyme Reverse Transcriptase theo kit "SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit" (Invitrogen). Dựa trên thông tin một đoạn gen *hemocyanin* đã công bố trên GenBank (mã số AF431737), chúng tôi thiết kế mỗi đặc hiệu GSP1 (Hình 1, Bảng 1) Mỗi đặc hiệu này kết hợp với mỗi UPM (Universal Primer A Mix), cung cấp bởi kit "SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit" (Invitrogen) để nhân đoạn gen *hemocyanin* kéo dài về phía đầu 5' (gọi tắt là: đoạn 5'-*hemocyanin*). Phản ứng 5'RACE được tiến hành với cặp mỗi GSP1/UPM. Sản phẩm 5'RACE được điện di kiểm

tra trên gel agarose 0,8% (Hình 2A).

Kết quả ở hình 2A cho thấy sản phẩm 5'RACE khuếch đại đoạn 5'-*hemocyanin* có kích thước khoảng 1200 bp phù hợp với tính toán lý thuyết (Bảng 1). Như vậy, từ vị trí mỗi GSP1 chúng tôi đã kéo dài thêm vào trình tự đã biết khoảng 700 bp về phía đầu 5'. Sản phẩm 5'RACE này được tinh sạch từ agarose gel và tách dòng phân tử trong vector pCR2.1 (Invitrogen). Để kiểm tra các dòng plasmid tái tổ hợp mang gen *hemocyanin* chúng tôi sử dụng enzyme giới hạn *HindIII* và *XhoI*, hai enzyme này sẽ cắt đoạn 5'-*hemocyanin* (nếu có) ra khỏi vector tái tổ hợp.

Sau khi phân tích các dòng plasmid tái tổ hợp bằng enzyme *HindIII* và *XhoI*, kết quả điện di cho thấy mỗi plasmid bị cắt thành hai đoạn: một đoạn lớn có kích thước tương ứng với vector pCR2.1 (~4 kb) và một đoạn nhỏ hơn có kích thước khoảng 1,3 kb tương ứng với sản phẩm 5'RACE và một phần của vector pCR2.1 (Hình 2B). Như vậy, bước đầu chúng tôi khẳng định các dòng plasmid này đã có gắn đoạn 5'-*hemocyanin*.



Hình 2. Kết quả tách dòng đoạn 5'-*hemocyanin*. A. Sản phẩm nhân đoạn 5'-*hemocyanin* bằng kỹ thuật 5'RACE (M: Marker 1 kb, 1 Sản phẩm 5'RACE nhân đoạn 5'-*hemocyanin*). B. Kiểm tra sự có mặt của sản phẩm 5'RACE trong vector tái tổ hợp (M. Marker 1 kb; 1-5 Plasmid pCR2.1 mang đoạn 5'-*hemocyanin*).

Xác định trình tự đoạn 5'-*hemocyanin*

Các dòng plasmid mang đoạn 5'-*hemocyanin* được tinh sạch và làm khuôn cho chuỗi phản ứng đọc trình tự. Kết quả xác định trình tự được trình bày ở hình 3.

Kết quả đọc trình tự cho thấy đoạn 5'-*hemocyanin* chúng tôi phân lập được với cặp mỗi UPM/GSP1 có chiều dài 1212 bp, trong đó đoạn từ

vị trí 755-1212 trùng khớp với đoạn đầu của trình tự đã biết (AF431737). Chúng tôi đã xác định được thêm 709 bp về phía đầu 5' bao gồm 7 bp thuộc đoạn 5'-UTR và 702 bp thuộc ORF của gen *hemocyanin*. Như vậy, kết hợp với 1350 bp đã biết (AF431737) ta có thể suy ra trình tự gen *hemocyanin* đầy đủ là 2052 bp. Trình tự nucleotide đoạn 5'-*hemocyanin* bao gồm cả đoạn 5'-UTR mà chúng tôi đã phân lập được là mới và chưa được công bố trên GenBank.

10	20	30	40	50	60	70	80	
CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT GATCCAC					GGGACCGTCAACATGAAGGCTTGT			
					M G T V N M K V L			
90	100	110	120	130	140	150	160	
ATATTCGGCTCTCGTGGCGCTGCTGGCGCTGGCGGACCTTTGGCTTCCAGTCGGACGGCGGGGGTGGCGGCTGATGG								
L L F G A L V A A A A A W P N F C P Q S D A G G A A D A								
170	180	190	200	210	220	230	240	
GGAAGCAACATGACGTAAACCTCCGGTTCATAAATATCAAGGGATATCCCTGACTTTAAT								
Q K Q H D V N F L L H K I Y G D I R D S N L K G K A D								
250	260	270	280	290	300	310	320	
CTCCCTTACCCGGGAAGCCAAATCTCCCAATTACAGTGAAGGAGCTAAAGCAATACAGAAACTTATGAGAGACCTGAAG								
S F D P E A N L S H Y S D G G K A V Q K L M R D L K								
330	340	350	360	370	380	390	400	
ATAACAGCGCTTCAACAAAGGCAATGGTCTCTCTCTTCCCTCTAGGCCAAGCGAAGAGCACTTATGCTTTTAA								
D N R L L Q Q R H W F S L F N P R Q R E E A L M L F D								
410	420	430	440	450	460	470	480	
TTTCTCATCTGAAGATTGGGATACATTTTTCAGCAATGCTGGCTATTTCCGCCAAATATGAATGAGGGGAAAT								
V L I H C K D W D T F V S N A A Y F R Q I M N E G E F								
490	500	510	520	530	540	550	560	
GGTTATGCTTTTAAATTTGGCGGCTCAAGCACTACCTCTCTTAAACAGCTGTATCTCTCTCCCTCTAAGAGGACAG								
V Y A L Y V A V I H S P L S E H V V L P P L Y E V T								
570	580	590	600	610	620	630	640	
GACATCTTCAACCAAGCAATTTGAGCACTTATGGCCCAAGAAACCAAAACCTGGTAAATTTAAGT								
P H L F T N S E V I E A A Y R A K Q T Q K P G K F K S								
650	660	670	680	690	700	710	720	
AGCTTCACTGSPATGAAGAATCTTGAAGAATAGCTTATTTGGAGAGGACATTGGAATCAACTCATCAG								
S F T G T K K N P E Q R V A Y F G E D T G H N T H H V								
730	740	750	760	770	780	790	800	
AGCTGGATATGGAATTTGCCATTCTGGTGGGAGCAAAATACAGCCATCATCTGGATCGCAAAGGAGAGAAATTTCTTCT								
T W H M E F P F W W D D K Y S H H L D R K G E N F F								
810	820	830	840	850	860	870	880	
GGGTACATCAACTTACCGTTCGTTTGTATGCTGAACGCTCTCCAATATTGGATCCCGTCGACGAACCTTCACTGG								
W V H H Q L T V R F D A E R L S N Y L D P V D E L R W								
890	900	910	920	930	940	950	960	
GAGAAGCCAATCGTACAAGTTTTGCTCCCCACACCCTTACAGTATGGAGGTCAGTCCCTCTCGTCCAGATAATGT								
E K P I V Q G F A P H T T Y K Y G G Q F P S R P D N V								
970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040	
AGACTTCGAGGATGGATGGGTGTGCTGCTATTGAGACTTGGCTATTGTAGAGCGCGAATCCCGGATGCTATTGCAC								
D F E D V D G V A R I R D L L I V E S R I R D A I A								
1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	
ATGGTTATATCGTCGACAGGGCTGGTAATCATATTGATATCATGAATGAGCGTGAATTTGACGTTCTTGGAGATGTTATT								
H G Y I V D R A G N H I D I M N E R G I D V L G D V I								
1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200	
GAATCATCTTTGTACAGCCATAATGTCAGTACTATGGAGCCTTGACAATACTGCTCACATTGTACTTGGTCGACAGAG								
E S S L Y S P N V Q Y Y G A L H N T A H I V L G R Q S								
1210								
<u>TGATCCACATGG</u>								
D P H								

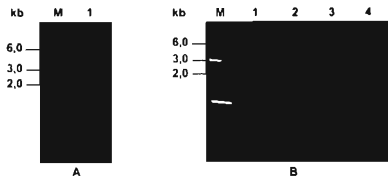
Hình 3. Trình tự nucleotide và amino acid suy diễn của đoạn 5'-hemocyanin. Phần gạch chân là trình tự của hai môđ UPM và GSP1. Phần in đậm là trình tự 5'-UTR. Phần có màu nền xám là trình tự mã hóa hemocyanin mới được xác định thêm.

Phân lập gen *hemocyanin* hoàn chỉnh

Dựa trên cơ sở trình tự đoạn gen *hemocyanin* đã công bố trên GenBank (AF431737) và đoạn 5'-*hemocyanin* đã phân lập được, chúng tôi thiết kế mỗi đầu nhân gen *hemocyanin* hoàn chỉnh (Hình 1; Bảng 1). Mẫu mRNA tách chiết và tinh sạch từ mô gan của tôm sú bị bệnh đốm trắng được dùng làm khuôn tổng hợp sợi cDNA thứ nhất bằng cách sử dụng môi trường Oligo(dT). Phản ứng RT-PCR sau đó được tiến hành với cDNA thu được. Sản phẩm RT-PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 0.8% (Hình 4).

Kết quả ở Hình 4A cho thấy sản phẩm RT-PCR nhân gen *hemocyanin* có kích thước khoảng

2,0 kb đúng với tính toán lý thuyết. Sản phẩm này được tinh sạch từ gel agarose và tách dòng vào vector pJET1.2 (Fermentas). Để kiểm tra các plasmid tái tổ hợp chúng tôi sử dụng hai enzyme giới hạn *Xba*I và *Xho*I, cho phép cắt gen *hemocyanin* (nếu có) ra khỏi vector. Sau khi phân tích các dòng plasmid tái tổ hợp bằng enzyme *Xba*I và *Xho*I, kết quả điện di cho thấy mỗi plasmid bị cắt thành hai đoạn: một đoạn lớn có kích thước tương ứng với vector pJET 1.2 (~3kb) và một đoạn nhỏ hơn có kích thước 2,0 kb tương ứng với sản phẩm RT-PCR gen *hemocyanin* (Hình 4B). Như vậy, bước đầu chúng tôi khẳng định các dòng plasmid này đã có gắn gen *hemocyanin*.



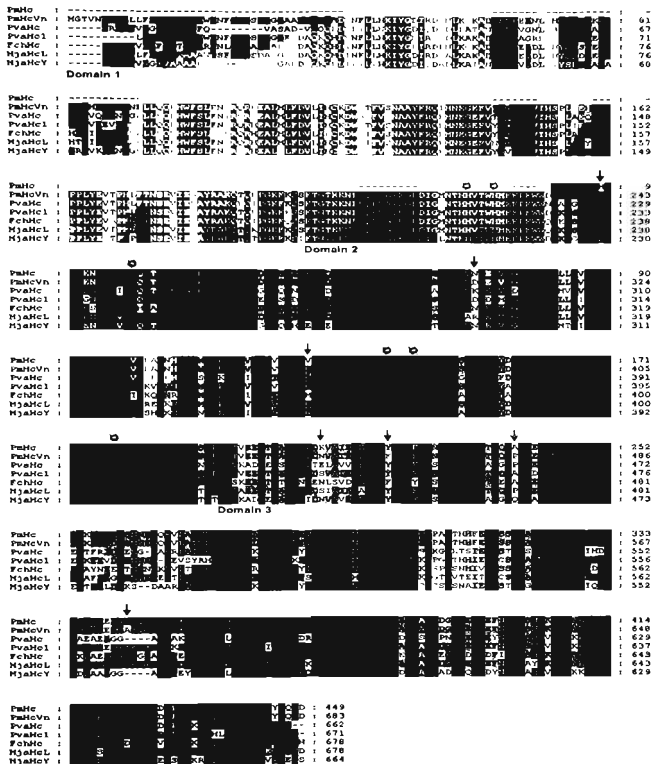
Hình 4. Kết quả tách dòng gen *hemocyanin*. A. Sản phẩm nhân gen *hemocyanin* bằng kỹ thuật RT-PCR (M: Marker 1 kb, 1: Sản phẩm RT-PCR nhân gen *hemocyanin*). B. Kiểm tra sự có mặt của sản phẩm RT-PCR trong vector tái tổ hợp (M: Marker 1 kb; 1-4: Plasmid pJET 1.2 mang gen *hemocyanin*)

Xác định trình tự và phân tích gen *hemocyanin*

Chúng tôi xác định trình tự của gen *hemocyanin* đầy đủ gắn trong vector pJET 1.2 và tách dòng. Phân tích trình tự, đã khẳng định được chắc chắn rằng đoạn cDNA phân lập được là trình tự ORF hoàn chỉnh mã hóa hemocyanin. Trình tự gen *hemocyanin* đầy đủ có kích thước 2052 bp, mã hóa 683 amino acid và một mã kết thúc là TAG. Đoạn gen đã công bố trên GenBank mã số AF431737 tương ứng với vị trí 703 – 2052 của gen tách dòng.

Khi so sánh trình tự gen *hemocyanin* đầy đủ phân lập từ tôm sú Việt Nam với trình tự đoạn gen *hemocyanin* (genbank, AF431737) phân lập từ tôm sú Ấn Độ, chúng tôi thấy có sự sai khác 33 vị trí nucleotide. Sự sai khác trình tự nucleotide này dẫn đến sự sai khác trình tự amino acid ở 7 vị trí 242H→D, 304N→D, 360V→L, 443K→L, 453Y→F, 472A→P và 576G→A. Điểm đáng chú ý là hemocyanin ở tôm sú Việt Nam có thêm 5 amino acid ở trình tự đầu N. Ngoài ra, ở vị trí 242 (số thứ tự theo trình tự hemocyanin phân lập từ tôm sú Việt Nam của nghiên cứu này), đa phần các loài tôm (tôm

sú Việt Nam, tôm sú Ấn Độ, tôm thẻ chân trắng, tôm Trung Quốc) đều là D, trong khi đó ở tôm sú Ấn Độ là N; ở vị trí 360 của hầu hết các protein nghiên cứu đều là L thì ở tôm Ấn Độ là V; ở vị trí 547, 679 và 681 tương ứng hemocyanin tôm sú là F, Y và Q thì các protein còn lại là I và H; còn ở vị trí 576 hemocyanin tôm Ấn Độ và các hemocyanin còn lại là G riêng ở tôm sú Việt Nam là A. Kết quả nghiên cứu này đặt ra một vấn đề mới cần nghiên cứu sâu hơn về các SNPs trong gen *hemocyanin* của tôm sú. Mặt khác khi phân tích 6 amino acid histidin thực hiện chức năng liên kết với Cu - Vị trí bám cho phân tử oxy, chúng tôi thấy rằng các histidin này mang tính bảo thủ rất cao ở protein hemocyanin của các loài tôm (Hình 5). Theo các nghiên cứu trước đây, mỗi tiểu phần hemocyanin đều có 3 domain chức năng (Gaykema *et al.*, 1984; Markl, Decker, 1992; Volbeda, Hol, 1989), khi so sánh 3 domain chức năng ở trình tự nghiên cứu chúng tôi thấy rằng domain 1 và 3 có sự sai khác trình tự amino acid nhiều hơn domain 2. Trong các vị trí amino acid sai khác giữa trình tự hemocyanin Việt Nam với trình tự đã công bố mỗi domain có một vị trí sai khác amino acid.



Hình 5. So sánh (alignment) trình tự amino acid của hemocyanin giữa các loài khác nhau. Trong đó PmHc (hemocyanin tôm sú Ấn Độ mã số AF431737), PmHc VN (hemocyanin tôm sú Việt Nam được xác định qua nghiên cứu này), PvaHc và PvaHc1 (Hemocyanin tôm thẻ mã số X82502 và AJ250830), FchHc (tôm Tung Quốc mã số FJ594414), MjaHcL và MjaHcY (tôm càng xanh mã số EF375711 và EF375712). Phần trình tự có nền màu xám là phần đa số các loài (60-80%) có amino acid giống nhau hoàn toàn giữa các loài. Phần trình tự có nền màu trắng là phần đa số các loài (60-80%) có amino acid giống nhau. Mỗi tên chỉ vị trí khác nhau giữa trình tự hemocyanin mới được xác định với trình tự đã biết AF431737 và vị trí sai khác của hemocyanin tôm với các loài tôm khác. Dấu (*) chỉ gốc amino acid histidine bảo thủ.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tiến hành phân lập và xác định trình tự đoạn 5'-hemocyanin và trình tự hoàn chỉnh của gen hemocyanin từ mẫu mô gan của tôm sú nhiễm bệnh đốm trắng. Gen này có kích thước 2052 bp mã hóa cho 683 amino acid. Trình tự đoạn 5'-hemocyanin và gen hemocyanin hoàn chỉnh đã được đăng ký trên Genbank với mã số tương ứng là: JF352966.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện với kinh phí của đề tài "Nghiên cứu giải trình tự một phần bộ gen và xây dựng cơ sở dữ liệu genome tôm sú (*P. monodon*)" thuộc Chương trình Công nghệ sinh học thủy sản 2008-2010, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn; và đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo "Nghiên cứu đặc điểm cấu trúc gen syntenin thuộc hệ miễn dịch tôm sú (*Penaeus monodon*) liên quan đến bệnh đốm trắng".

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Adachi K, Wakamatsu K, Ito S, Miyamoto N, Kokubo T, Nishuoka T (2005) An oxygen transporter hemocyanin can act on the late pathway of melanin synthesis. *Pigment Cell Res* 18: 214-219.

Decker H, Jaenicke E (2004) Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Dev Comp Immunol* 28(7-8): 673-687.

Decker H, Rimke T (1998) Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. *J Biol Chem* 273(40): 25889-25892.

Decker H, Ryan M, Jaenicke E, Terwilliger N (2001) SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurytelma californicum*, and Cancer magister. *J Biol Chem* 276(21): 17796-17799.

Destoumieux-Garzon D, Saulnier D, Garnier J, Jouffrey C, Bulet P, Bachere E (2001) Crustacean immunity. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J Biol Chem* 276(50): 47070-47077.

Destoumieux D, Bulet P, Strub JM, Van Dorsselaer A, Bachere E (1999) Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *Eur J Biochem* 266(2): 335-346.

Gaykema W, Hol W, Vereijken J, Soeter N, Bak H, Beintema J (1984) A α structure of the copper-containing, oxygen-carrying protein Panulirus interruptus haemocyanin. *Nature* 309: 23-29.

Hagner-Holler S, Schoen R, Erker W, Marden JH,

Rupprecht R, Decker H, Burmester T (2004) A respiratory hemocyanin from an insect. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(3): 871-874.

Hoàng Thị Thu Yến, Kim Thị Phương Oanh, Trần Trung Thành, Phạm Anh Tuấn, Nông Văn Hải (2010) Phân lập và xác định trình tự hoàn chỉnh cDNA mã hóa syntenin liên quan đến đáp ứng miễn dịch đối với bệnh đốm trắng ở tôm sú (*Penaeus monodon*). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 8(2): 155-163.

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284(5418): 1313-1318.

Iwanaga S, Lee BL (2005) Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J Biochem Mol Biol* 38(2): 128-150.

Jaenicke E, Foll R, Decker H (1999) Spider hemocyanin binds ecdysone and 20-OH-ecdysone. *J Biol Chem* 274(48): 34267-34271

Jiang N, Tan NS, Ho B, Ding JL (2007) Respiratory protein-generated reactive oxygen species as an antimicrobial strategy. *Nat Immunol* 8(10): 1114-1122.

Jiravanichpaisal P, Lee BL, Soderhall K (2006) Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 211(4): 213-236.

Kusche K, Burmester T (2001) Diplopod hemocyanin sequence and the phylogenetic position of the Myriapoda. *Mol Biol Evol* 18(8): 1566-1573.

Kusche K, Ruhberg H, Burmester T (2002) A hemocyanin from the Onychophora and the emergence of respiratory proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(16): 10545-10548.

Lee SY, Lee BL, Soderhall K (2003) Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus lenusculus*. *J Biol Chem* 278(10): 7927-7933.

Lei K, Li F, Zhang M, Yang H, Luo T, Xu X (2008) Difference between hemocyanin subunits from shrimp *Penaeus japonicus* in anti-WSSV defense. *Dev Comp Immunol* 32(7): 808-813.

Lightner D, Redman R (1998) Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* 164: 201-220.

Lightner DV (1983) Diseases of cultured Penaeid shrimp. In *Handbook of Mariculture, Vol 1, Crustacean of aquaculture* (McVey JP ed): 289-320.

Liu H, Soderhall K, Jiravanichpaisal P (2009) Antiviral immunity in crustaceans. *Fish Shellfish Immunol* 27(2): 79-88.

Mangum CP (1985) Oxygen transport in invertebrates. *Am J Physiol* 248(5 Pt 2): R505-514.

Markl J (1986) Evolution and function of structurally

diverse subunits in the respiratory protein hemocyanin from arthropods. *Biol Bull* 171: 90-115.

Markl J, Decker H (1992) Molecular structure of the arthropod hemocyanins. *Adv Comp Environ Physiol* 13: 325-376.

Markl J, Stocker W, Runzler R, Precht E (1986) *Immunological correspondences between the hemocyanin subunits of 86 arthropods: evolution of a multigene protein family*. In: Linzen B (ed) *Invertebrate oxygen carriers*. Springer, Heidelberg, 281-292.

Miller K, Elderl N, Arisaka F, van Holde K (1977) Structure and function of hemocyanin from thalassinid shrimp. *J Comp Physiol B* 115: 171-184.

Nagai T, Kawabata S (2000) A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense. *J Biol Chem* 275(38): 29264-29267.

Nagai T, Osaki T, Kawabata S (2001) Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides. *J Biol Chem* 276(29): 27166-27170.

Paul R, Pirow R (1998) The physiological significance of respiratory proteins in invertebrates. *Zoology* 100: 298-306

Pick C, Schneuer M, Burmester T (2009) The occurrence of hemocyanin in Hexapoda. *FEBS J* 276(7): 1930-1941.

Scherbaum S, Enas B, Gebauer W, Burmester T (2010) Characterization of hemocyanin from the peacock mantis shrimp *Odonotodactylus scyllarus* (Malacostraca, Hoplocanda). *J Comp Physiol B* 180(8): 1235-1245

Sellos D, Lemoine S, Van Wormhoudt A (1997) Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): structure, evolution and physiological aspects. *FEBS Lett* 407(2): 153-158.

Shekhar MS, Lu Y (2009) Application of nucleic-acid-based therapeutics for viral infections in shrimp aquaculture. *Mar Biotechnol (NY)* 11(1): 1-9.

Tassanakajon A, Amparyup P, Somboonwivat K, Supungul P (2010) Cationic antimicrobial peptides in penaeid shrimp. *Mar Biotechnol (NY)* 12(5): 487-505.

Vargas-Albores F, Yepiz-Plascencia G (2000) Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture* 192: 13-21.

Voit R, Feldmaier-Fuchs G (1990) Arthropod hemocyanins. Molecular cloning and sequencing of cDNAs encoding the tarantula hemocyanin subunits a and e. *J Biol Chem* 265(32): 19447-19452.

Volbeda A, Hol WG (1989) Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å resolution. *J Mol Biol* 209(2): 249-279.

Zhang X, Huang C, Qin Q (2004) Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*. *Antiviral Res* 61(2): 93-99

Zhang X, Huang C, Xu X, Hew CL (2002) Identification and localization of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein. *J Gen Virol* 83(Pt 5): 1069-1074.

Zhang Y, Wang S, Xu A, Chen J, Lin B, Peng X (2006) Affinity proteomic approach for identification of an IgA-like protein in *Litopenaeus vannamei* and study on its agglutinin characterization. *J Proteome Res* 5(4): 815-821.

Zhang Y, Yan F, Hu Z, Zhao X, Min S, Du Z, Zhao S, Ye X, Li Y (2009) Hemocyanin from shrimp *Litopenaeus vannamei* shows hemolytic activity. *Fish Shellfish Immunol* 27(2): 330-335.

CLONING AND SEQUENCING OF THE COMPLETE cDNA ENCODING HEMOCYANIN ASSOCIATED WITH IMMUNE RESPONSE OF SHRIMP TO WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (*PENAEUS MONODON*)

Hoang Thi Thu Yen¹, Kim Thi Phuong Oanh², Pham Anh Tuan³, Nong Van Hai^{2*}

¹Thai Nguyen University

²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

³Directorate of Fisheries, Vietnam Ministry of Agriculture and Rural Development

SUMMARY

Hemocyanin is a large, copper-containing protein present in the hemolymph of both mollusks and arthropods. The traditional role of hemocyanin is the transport and storage of molecular oxygen. To day, it is known that hemocyanin is a multifunctional protein, especial function related to antiviral, antimicrobial and antifungal immune responses. A partial coding sequence of cDNA encoding hemocyanin consisted of 1470

* Author for correspondence: Tel/Fax: 84-4-38363222; E-mail vhnong@ibt.ac.vn

nucleotides including stop codon and 3'-UTR is available from GenBank with accession number AF431737. In this study, we cloned and sequenced the full length cDNA encoding syntenin from WSSV infected black tiger shrimp. Using 5'RACE technique, we determined 5'-end sequence including initial codon and 5'-UTR. Based on the 5'-end sequence and the GenBank sequence (AF431737), the complete hemocyanin cDNA was cloned and sequenced. The coding region of hemocyanin cDNA was 2052 bp in length, and was predicted to encode a 683 amino acid protein. The putative protein contains 3 domains and 6 conserved histidines to set structure and function. The result of nucleotide sequence alignment between the newly determined hemocyanin sequence and that of WSSV infected *Penaeus monodon* isolated in India showed that there are 33 different nucleotides in the two sequences. The nucleotide differences were found to result in 7 amino acid substitutions including 242H→D, 304N→D, 360V→L, 443K→L, 453Y→F, 472A→P and 576G→A. Our results would be useful for further study of the function of hemocyanin and related proteins in the shrimp immune response.

Keywords: Black tiger shrimp, immune-related gene, *Penaeus monodon*, Hemocyanin, WSSV