

NGHIÊN CỨU TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GEN THERMOSTABLE DIRECT HEMOLYSIN (TDH) CỦA VI KHUẨN *VIBRIO* SP. PHÂN LẬP TỪ CÁ HỒNG MỸ Ở VÙNG VEN BIỂN THỪA THIÊN-HUẾ TRONG TẾ BÀO *E. COLI* BL21 (DE3)

**Đặng Thanh Long¹, Nguyễn Thái Hoàng², Huỳnh Văn Chương¹,
Hoàng Thị Kim Hồng³, Lê Lý Thùy Trâm⁴, Chế Thị Kim Ngân³, Nguyễn Thanh Phú³**

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tạo dòng và biểu hiện thành công gen *tdh* mã hóa tạo kháng nguyên độc tố bền nhiệt của vi khuẩn *Vibrio* sp. gây bệnh xuất huyết lở loét ở cá hồng Mỹ nuôi ở vùng ven biển tỉnh Thừa Thiên-Huế. Vùng gen mã hóa tạo kháng nguyên độc tố bền nhiệt (*tdh*) có kích thước 570 bp, mức tương đồng của trình tự gen là 100% so với trình tự gen *tdh* công bố trên GenBank (mã số: S67841.1). Vùng gen *tdh* mã hóa tạo chuỗi polypeptide hoàn chỉnh dài 189 acid amin và có mức tương đồng là 100% so với chuỗi polypeptide công bố trên GenBank (mã số: AAP14018.1). Kết quả phân tích điện di SDS cho thấy protein dung hợp 6xHis-TDH có khối lượng phân tử xấp xỉ 24,6 kDa.

Từ khóa: Gen *tdh*, *Vibrio*, tỉnh Thừa Thiên-Huế, thermostable direct hemolysin (*tdh*).

Study on cloning and expressing *thermostable direct hemolysin (tdh)* gene of *Vibrio* sp. bacteria isolated from red drum (*Sciaenops ocellatus*) raising in Thua Thien-Hue province in *E. coli* cell - BL21 (DE3)

**Dang Thanh Long, Nguyen Thai Hoang, Huynh Van Chuong,
Hoang Thi Kim Hong, Le Ly Thuy Tram, Che Thi Kim Ngan, Nguyen Thanh Phu**

SUMMARY

In this study, we have cloned and expressed successfully the encoded gene to create thermostable direct hemolysin (*tdh*) toxin antigen of *Vibrio* sp., which caused the ulcer disease in red drum (*Sciaenops ocellatus*) raising in coastal areas of Thua Thien-Hue province. The full-length of *tdh* gene was 570 bp, similarity level of this gene sequence was 100% compared to the *tdh* gene sequence published in the GenBank (accession number: S67841.1). The *tdh* gene creating an entire polypeptide sequence consisted of 189 amino acids and its similarity level was 100% compared to the polypeptide chain published in the GenBank (accession number: iAP14018.1). The result of analyzing SDS electrophoresis showed that 6xHis-TDH fusion protein had a molecular weight of approximately 24.6 kDa.

Keywords: *tdh* gene, *Vibrio*, Thua Thien-Hue, thermostable direct hemolysin (*tdh*).

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh xuất huyết lở loét ở cá là một bệnh rất nguy hiểm, lây lan nhanh và xuất hiện tại nhiều nước trên thế giới. Nguyên nhân gây bệnh

là nấm, virus, ký sinh trùng và nguyên nhân gây bệnh thứ cấp là vi khuẩn. Đến nay đã có khoảng 24 quốc gia trên thế giới thông báo sự xuất hiện của bệnh xuất huyết lở loét và tập trung chủ yếu ở Bắc Mỹ, Nam Phi, châu Á và Úc. Dấu hiệu đặc trưng của bệnh được thể hiện bởi sự hiện diện của các vết loét nghiêm trọng ở ngoài da, trên đầu, giữa cơ thể và trên

¹ Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

² Trường Trung học phổ thông Lê Lợi, Pleiku, Gia Lai

³ Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

⁴ Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng

các vùng lưng, cá có thể chết trong vòng một tuần sau khi bị nhiễm bệnh. Ước tính của Ngân hàng thế giới năm 1997, tổn thất do dịch bệnh gây ra cho ngành nuôi trồng thủy sản xấp xỉ 3 tỷ USD [11].

Các loài *Vibrio* chính gây bệnh lở loét ở cá trên thế giới bao gồm *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus* [1]. Căn bệnh này liên quan đến hơn 100 loài cá [6]. Chúng gây bệnh bằng cách sản sinh ra các độc tố hay nội độc tố với lượng lớn. Bệnh được thể hiện đặc trưng bởi nhiễm trùng huyết, xuất huyết và tổn thương da. Do tính chất bền vững của bộ gen vi khuẩn *Vibrio*, thường xuyên xảy ra hiện tượng chuyển gen ngang và trong môi trường biển, ranh giới loài rất hẹp [4]. Do đó, việc xác định các loài liên quan đến *Vibrio* được phân lập từ môi trường biển đôi khi rất khó khăn [3]. Độc tố hay nội độc tố được cho là các phân tử chịu trách nhiệm về độc lực của các loài *Vibrio*, tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào về mô học đề cao đến những giả thuyết này [5].

Hemolysin là một độc tố có trong vi khuẩn *Vibrio* sp. Chúng phá vỡ màng hồng cầu với sự giải phóng của hemoglobin, được cho là độc tố phân bố rộng rãi nhất trong số *Vibrio* sp. gây bệnh và có nhiều vai trò khác nhau trong quá trình lây nhiễm [10]. Có 5 họ hemolysin đại diện trong *Vibrio* sp., trong đó có hai họ hemolysin không bền nhiệt (TLH) và hemolysin bền nhiệt (thermostable direct hemolysin - TDH) đã được nhiều tác giả quan tâm nghiên cứu [14].

Độc tố TDH (thermostable direct hemolysin) là loại độc tố gây dung huyết kiểu β , bền nhiệt (không bị bất hoạt ở 100°C trong 10 phút) thuộc họ hemolysin bền nhiệt TDH, chúng có mặt trong các loài vi khuẩn *Vibrio*. Cấu trúc protein của TDH tồn tại ở dạng dimer bao gồm hai tiểu đơn vị protein có khối lượng phân tử 21 kDa liên kết với nhau, có tính kháng nguyên cao [8, 7]. Độc tố TDH ở *V. parahaemolyticus* đã được chứng minh có khả năng gây vỡ tế bào bằng cách bám dính, tạo ra các lỗ tấn công màng tế bào vật chủ (pore-forming toxin), làm rối loạn trao đổi ion và phá vỡ màng tế bào do mất cân

bằng thẩm thấu [12]. Mục đích của nghiên cứu này là tạo dòng và biểu hiện thành công gen *thermostable direct hemolysin (tdh)* của vi khuẩn *Vibrio* sp. gây bệnh xuất huyết lở loét ở cá hồng Mỹ nuôi ở vùng ven biển ở Thừa Thiên-Huế trong tế bào vật chủ *E. coli* BL21 (DE3) ở dạng dung hợp tái tổ hợp để làm nguyên liệu cho sản xuất vaccin, kháng thể phòng trị bệnh do vi khuẩn *Vibrio* sp. gây ra.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu nghiên cứu

Vi khuẩn *Vibrio* sp. phân lập từ cá hồng Mỹ có biểu hiện xuất huyết lở loét, thu ở vùng ven biển Thừa Thiên-Huế do Bộ môn Miễn dịch học và vaccin, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế cung cấp.

Chúng vi khuẩn *E. coli* TOP10, BL21 (DE3), vector pGEM®-T Easy (Invitrogen), vector pET200/D-TOPO (Invitrogen), kit tinh sạch gel Isolate II PCR and Gel (Bioline) và kit tách và tinh sạch plasmid tái tổ hợp (EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps Kit, Bio Base INC).

Một số hóa chất thông dụng khác: NaCl (Merck), CTAB (Trimethyl Ammonium Bromide, Merck), ampicilin (Sigma), Peptone (Difco), Tris-HCl (Bio Base INC), EDTA (Bio Base INC), Proteinase K (20 mg/ml, Sigma), Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Bio Base INC), Chloroform (Merck), Isoamyl alcohol (Merck), Phenol (Merck), Ethyidium bromide (Merck).

Nghiên cứu được thực hiện vào tháng 6/2019 tại phòng thí nghiệm Miễn dịch học và vaccin, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số từ vi khuẩn *Vibrio* sp. được tách chiết theo mô tả của Panicker và cs. (2004) có sự thay đổi cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm [9]. Sinh khối tế bào vi khuẩn *Vibrio* sp. được thu nhận từ 1 ml huyền dịch nuôi cấy

ở 35°C trong 18 giờ bằng máy ly tâm lạnh ở 15.000 vòng/phút trong thời gian 2 phút. Sau đó tái huyền phù trong 500 µl đệm TE (10 mM Tris-HCl, 1,0 mM EDTA, pH 8). Tế bào được phá vỡ bằng cách bổ sung thêm 30 µl SDS 10% (khối lượng/thể tích) và 5 µl proteinase K (20 mg/ml, Sigma). Sau 1 giờ ủ, bổ sung 100 µl NaCl 5M và 80 µl Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)-hòa tan trong NaCl (10% CTAB trong 0,7 M NaCl) để tạo phức với polysaccharide. DNA tổng số được tinh sạch nhằm loại bỏ protein và các thành phần tế bào khác bằng cách bổ sung một thể tích tương đương (715 µl) hỗn hợp chloroform-isoamyl alcohol (24:1) và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút. Pha lỏng ở phía trên được chuyển sang ống tube mới và tiếp tục bổ sung một thể tích tương đương hỗn hợp phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút. Dùng pipette hút pha lỏng ở phía trên chuyển vào ống tube mới và tiếp tục bổ sung 1 thể tích của isopropanol giữ ở -20°C trong 30 phút. Kết tủa được thu nhận bằng ly tâm 13.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C và rửa lại 3 lần với 70% ethanol (thể tích/thể tích), sau đó làm khô tủa DNA ở nhiệt độ phòng. Hòa tan kết tủa trở lại với 50µl trong đệm TE. DNA tổng số của vi khuẩn *Vibrio* sp. được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8% với điện thế cung cấp là 80V trong đệm TAE (40 mM Tris pH: 7,6, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA) với thuốc nhuộm ethidium bromide (0,5 µg/L).

2.2.2. Phương pháp PCR phân lập gen *thermostable direct hemolysin (tdh)*

DNA tổng số thu được sau khi tách chiết từ vi khuẩn *Vibrio* sp. được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR phân lập gen *tdh* mã hóa tạo kháng nguyên độc tố bền nhiệt TDH với cặp mồi đặc hiệu được thiết kế dựa trên trình tự nucleotide được đăng ký trên Genbank có mã số DQ440529.1 thông qua phần mềm Primer3plus [13]. Thành phần nucleotide của cặp mồi đặc hiệu cho gen:

VptdhF: 5'-ACCATGATGAAAAAACAAT-CACAC-3'

VptdhR: 5'-TTAGAAACGGTACTCG-GCTAAGTTG-3'

Thành phần phản ứng PCR gồm có: 50 ng DNA khuôn; 12,5 µl 2×PCR master mix (2,4 mM dNTP mỗi loại; 0,3 đơn vị Taq-DNA polymerase); 10 pmol VptdhF; 10 pmol VptdhR và bổ sung nước cất vô trùng để đạt thể tích phản ứng là 25µl. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy luân nhiệt MJ mini™ Personal Thermal cycler (BioRad) với chu trình nhiệt như sau: biến tính ở 95°C/5 phút, 30 chu kỳ tiếp theo: 95°C/45 giây, 51°C/1 phút, 72°C/1 phút và kéo dài mạch ở 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%, nhuộm màu bằng EtBr (0,5 µg/L) và phân tích hình ảnh điện di bằng hệ thống DyNA Light, Dual Intensity UV Transilluminator (Labnet).

2.2.3. Phương pháp tạo dòng gen

Sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch bằng kit Isolate II PCR and Gel sẽ được gắn vào vector pGEM®-T Easy theo phương pháp tạo dòng TA để tạo thành vector tái tổ hợp pGEM/*tdh*. Thành phần phản ứng gắn được chúng tôi tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất bao gồm: 50 ng vector pGEM®-T Easy, 5 µl đệm gắn 2X, 3 đơn vị enzyme T₄ DNA ligase; 28,6 ng sản phẩm PCR sau khi tinh sạch và bổ sung nước vô trùng để đạt thể tích cuối cùng 10 µl, phản ứng được ủ qua đêm ở 4°C. Sản phẩm plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10 bằng phương pháp hóa biến nạp. Tế bào biến nạp được chọn lọc bằng phương pháp khuẩn lạc xanh-trắng theo cơ chế X-gal và kháng sinh, khuẩn lạc màu trắng được chọn lọc để kiểm tra sự hiện diện của gen *tdh* bằng phản ứng PCR với cặp mồi M13 (M13F: 5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3' và M13R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') được thiết kế sẵn hai đầu của vector pGEM®-T Easy.

Các dòng khuẩn lạc dương tính được nuôi tăng sinh, thu sinh khối tế bào và tách chiết, tinh sạch plasmid tái tổ hợp theo kit plasmid EZ-10, BS6141 (BioBase INC). Gen *tdh* được phân tích trình tự bằng phương pháp dideoxy

terminator trên máy ABI 3031 Analysis ở công ty Macrogen (Hàn Quốc), hiệu chỉnh bằng phần mềm BioEdit và so sánh mức độ tương đồng với trình tự đã được công bố trên GenBank bằng chương trình BLAST.

2.2.4. Phương pháp biểu hiện gen *tdh* trong vector pET200/D-TOPO

Vector tái tổ hợp pGEM/*tdh* được sử dụng làm khuôn mẫu để thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu được thiết kế cho phù hợp khi gắn vào vector biểu hiện pET200/D-TOPO. Trình tự mồi như được trình bày ở trên. Trong đó, mồi xuôi VptdhF được thiết kế có gắn thêm trình tự CACC ở đầu 5' giúp tạo dòng định hướng cho sản phẩm PCR trong vector; 4 nucleotide này được thiết kế bổ sung cho phần lồi GTGG của vector pET200/D-TOPO. Thành phần phản ứng PCR gồm có 1 μ L vector tái tổ hợp pGEM/*tdh* (50 ng), 10 pmol mồi xuôi VptdhF, 10 pmol mồi ngược VptdhR, 5 μ L đệm PCR 10X, 1 μ L dNTP (10 pmol/ μ L), 0,5 μ L enzyme pfu (5 U/ μ L), nước cất vô trùng vừa đủ 50 μ L với chu trình nhiệt như mô tả trên.

Sản phẩm PCR được cắt ra trên gel agarose 1% và tinh sạch bằng kit Isolate II PCR and Gel (Bioline), sau đó gắn vào vector pET200/D-TOPO mang promoter T7 (Invitrogen). Thành phần phản ứng gắn bao gồm sản phẩm PCR sau tinh sạch (13 ng), 1 μ L vector pET200 (20 ng/ μ L), 1 μ L đệm gắn, nước cất vô trùng để đạt thể tích gắn 6 μ L.

Trộn nhẹ và ủ ở 25°C trong 60 phút, sản phẩm phản ứng gắn được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* BL21 (DE3) bằng phương pháp hóa biến nạp. Thành phần bao gồm 6 μ L phản ứng gắn, 50 μ L tế bào khả biến *E. coli* BL21 (DE3) và 500 μ L môi trường SOC (2% tryptone, 0,5% dịch chiết nấm men, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose, pH = 7) [2], nuôi lắc 200 vòng/phút ở 37°C trong 60 phút. Tế bào biến nạp sau đó được trải đều trên đĩa petri chứa môi trường LB đặc (1% tryptone; 0,5% dịch chiết nấm men;

1% NaCl; 1,5% agar, pH 7,0) [2] có bổ sung 100 μ g/mL kanamycin và ủ ở 37°C qua đêm. Khuẩn lạc mọc trên môi trường chọn lọc được kiểm tra trực tiếp bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu.

Các tế bào *E. coli* có dương tính với phản ứng PCR được chọn lọc và nuôi tăng sinh trong bình tam giác chứa 50 mL môi trường YJ (2% glycerol; 1,5% tryptone; 2% dịch chiết nấm men; 0,25% K₂HPO₄.12 H₂O; 0,016% KH₂PO₄; 0,05% NaCl; 0,025% MgSO₄.7 H₂O) [2] có bổ sung 100 μ g/mL kanamycin ở 37°C; tốc độ lắc 180 vòng/phút. Khi mật độ tế bào của dịch nuôi cấy ở bước sóng 600 nm đạt tới 1,0 (OD₆₀₀ = 1,0) thì bổ sung 1 mM chất cảm ứng IPTG (Bio-Rad) và tiếp tục nuôi ở 37°C. Sinh khối tế bào *E. coli* tái tổ hợp sau mỗi 8 giờ cảm ứng được thu nhận bằng ly tâm 15.000 vòng/phút. Tái huyền phù tế bào trong đệm TNE (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA) 1% Triton X-100, 0,008 mg/mL lysozyme, ủ trong đá 60 phút có lắc, phá vỡ tế bào bằng siêu âm ở 40 puse trong 5 phút. Sự biểu hiện của protein dung hợp 6xHis-TDH được kiểm tra bằng điện di polyacrylamide gel 15% có SDS ở 80 V.

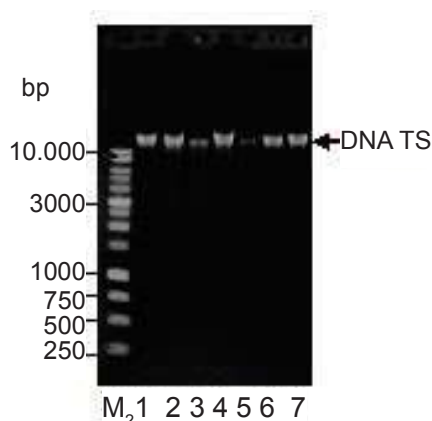
2.2.5. Xử lý số liệu

Chuỗi trình tự nucleotide được hiệu chỉnh bằng phần mềm BioEdit và so sánh bằng chương trình BLAST.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số của vi khuẩn *Vibrio* sp. sau khi tách chiết bằng phương pháp CTAB theo mô tả của Panicker và cs. (2004) sẽ được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 0,8%. Kết quả thể hiện ở hình 1 cho thấy DNA thu được có chất lượng tốt, nồng độ cao, một băng DNA rõ nét, đồng đều và sạch, không bị đứt gãy. Nguyên liệu DNA này có thể sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

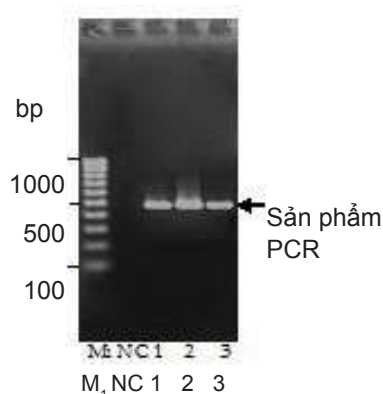


Hình 1. Kết quả tách chiết DNA tổng số trên gel agarose 0,8%

M_2 : khối lượng phân tử DNA chuẩn (250 -10.000 bp, Promega); 1-7: Số lần lặp lại khi tách chiết DNA tổng số từ vi khuẩn *Vibrio*

3.2. Phân lập gen *thermostable direct hemolysin (tdh)*

Gen *tdh* mã hóa tạo kháng nguyên độc tố bền nhiệt TDH của vi khuẩn *Vibrio* sp. được phân lập bằng phản ứng PCR trên máy luân nhiệt MJ mini™ Personal thermal cycler (BioRad). Kết quả cho thấy xuất hiện 1 băng DNA duy nhất, rõ, nồng độ cao có kích thước khoảng 574 bp (bao gồm cả 4 nucleotide CACC được thiết kế ở đầu 5' của mỗi xuôi). Điều này cho chúng tôi thấy rằng từ khâu thiết kế mỗi cho đến quá trình thực hiện phản ứng PCR đều diễn ra chính xác (hình 2).

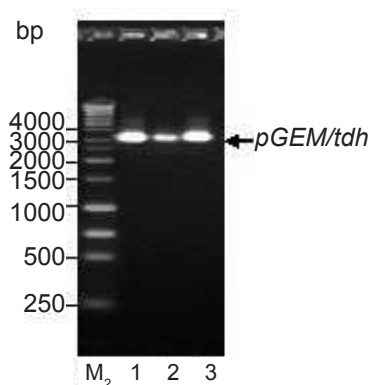


Hình 2. Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gen *tdh*

M_1 : khối lượng thang chuẩn DNA (100 -1000 bp, BioBase); NC: đối chứng âm; 1, 2 và 3: sản phẩm PCR với 3 lần lặp lại

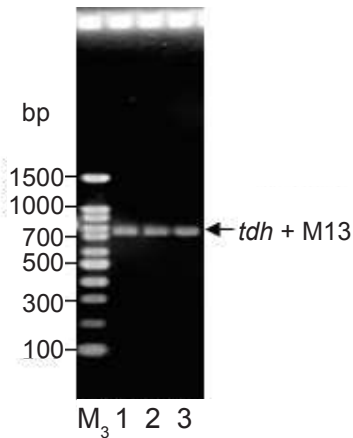
3.3. Kết quả tạo dòng và phân tích trình tự gen mã hóa kháng nguyên độc tố bền nhiệt TDH

Sản phẩm PCR thu được sau khi tinh sạch (gen *tdh*) có gắn thêm adenine (dA) vào đầu 3' (do đặc tính của enzyme Taq DNA polymerase) nhằm tạo liên kết bổ sung với thymidine (dT) đã được thiết kế trong vector pGEM®-T Easy bằng phương pháp tạo dòng (TA-cloning). Kết quả gắn vào vector và biến nạp vào tế bào vật chủ *E. coli* TOP10 thể hiện thông qua tách chiết plasmid tái tổ hợp và điện di trên gel agarose 1% trên hình 3 cho thấy chỉ có một băng duy nhất, đậm, rõ nét có kích thước khoảng 3.589 bp (bao gồm kích thước của vector pGEM®-T Easy là 3.015 bp và kích thước của gen *tdh* khoảng 574 bp). Sự hiện diện của gen *tdh* trong các tế bào *E. coli* TOP10 được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR gián tiếp thông qua cặp mồi M13 với khuôn mẫu là DNA plasmid tái tổ hợp pGEM/*tdh*. Kết quả cho thấy đã xuất hiện băng DNA có kích thước khoảng 774 bp (bao gồm kích thước của gen 574 bp và một đoạn khoảng 200 bp nằm trên vector pGEM®-T Easy) (hình 4). Qua đây kết luận được rằng, chúng tôi đã gắn thành công gen *tdh* vào vector pGEM®-T Easy và biến nạp được vào tế bào vật chủ *E. coli* chủng TOP10. Plasmid tái tổ hợp này được chúng tôi gửi phân tích trình tự nucleotide ở Công ty MacroGen (Hàn Quốc).



Hình 3. Ảnh điện di kiểm tra plasmid pGEM/*tdh* tái tổ hợp

M_2 : khối lượng thang chuẩn DNA (250 -10.000 bp, Promega), 1- 3: sản phẩm plasmid tái tổ hợp chứa gen *tdh* tách từ 3 khuẩn lạc



Hình 4. Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR với cặp mồi M13

M₃: thang chuẩn khối lượng DNA (100-1500 bp, BioBase); 1, 2 và 3: sản phẩm PCR của gen *tdh* với cặp mồi M13

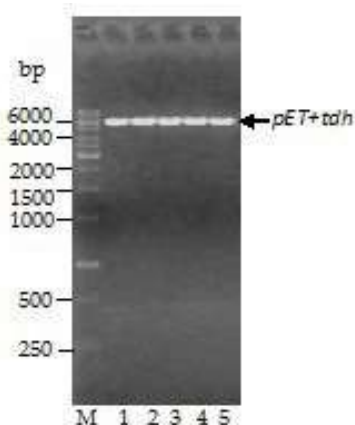
Kết quả phân tích trình tự cho thấy đoạn gen phân lập được có kích thước 570 bp (bao gồm cả bộ ba mở đầu ATG và bộ ba kết thúc TAA sau khi loại bỏ đầu nối CACC) và tương đồng 100% đối với trình tự nucleotide công bố trên GenBank với mã số S67841.1, trình tự này mã hóa tạo một chuỗi peptide suy diễn hoàn chỉnh và liên tục bao gồm 189 amino acid (không bao gồm bộ ba kết thúc TAA) và tương đồng 100% với trình tự amino acid công bố với mã số AAP14018.1 (hình 5). Như vậy, chúng tôi có thể khẳng định rằng đã tách dòng thành công gen *tdh* mã hóa kháng nguyên độc tố bền nhiệt TDH của vi khuẩn *Vibrio* sp. - một trong những tác nhân gây nên bệnh xuất huyết lở loét trên các hồng Mỹ thu tại vùng ven biển Thừa Thiên-Huế.

CDS: Putative 1	1	M K Y R Y F A K K S F L F I S M L A A F	
tdh	1	ATGAACTACCGATATTTTGCARAAAATCAITTTTATTATATCATGTTGGCAGCATT	60
S67841.1	169	ATGAACTACCGATATTTTGCARAAAATCAITTTTATTATATCATGTTGGCAGCATT	228
CDS:thermostable dir	1	M K Y R Y F A K K S F L F I S M L A A F	
CDS: Putative 1	21	K T F A F E L P S V F F P A P G S D E I	
tdh	61	AAACATTGGCTTTGAGCTTCACCTGTGCTTTTCTGCGCCCGGCTTCGATGAGATA	120
S67841.1	229	AAACATTGGCTTTGAGCTTCACCTGTGCTTTTCTGCGCCCGGCTTCGATGAGATA	288
CDS:thermostable dir	21	K T F A F E L P S V F F P A P G S D E I	
CDS: Putative 1	41	L F V V R D A T F N T N A F V N V K V S	
tdh	121	TTGTTTGTGTTGAGATGCAACTTTTAATACCAATGCAACGGTCAATGTAAAGGTCTCT	180
S67841.1	289	TTGTTTGTGTTGAGATGCAACTTTTAATACCAATGCAACGGTCAATGTAAAGGTCTCT	348
CDS:thermostable dir	41	L F V V R D A T F N T N A F V N V K V S	
CDS: Putative 1	61	D F N T N R N V K R K P Y K D V Y G Q S	
tdh	181	GACTTTTGGCAACCGTAATGTAAAGAGAAACCGTACAAAGATGTTTATGGTCAATCA	240
S67841.1	349	GACTTTTGGCAACCGTAATGTAAAGAGAAACCGTACAAAGATGTTTATGGTCAATCA	408
CDS:thermostable dir	61	D F N T N R N V K R K P Y K D V Y G Q S	
CDS: Putative 1	81	V F T T S G T K N L T S Y M T V N I N D	
tdh	241	GTATTCACACGTCAGGTACTAAATGGCTGACATGCTACATGACTGTGACATTAAATGAT	300
S67841.1	409	GTATTCACACGTCAGGTACTAAATGGCTGACATGCTACATGACTGTGACATTAAATGAT	468
CDS:thermostable dir	81	V F T T S G T K N L T S Y M T V N I N D	
CDS: Putative 1	101	K D Y T M A A V S G Y K R G H S A V F V	
tdh	301	AAAGACTATACATGGCAGCGTGTCTGCTGCTATAGCGCGGTCATTCTGCTGCTGCTA	360
S67841.1	469	AAAGACTATACATGGCAGCGTGTCTGCTGCTATAGCGCGGTCATTCTGCTGCTGCTA	528
CDS:thermostable dir	101	K D Y T M A A V S G Y K R G H S A V F V	
CDS: Putative 1	121	K S D Q V Q L Q H S Y N S V A N F V G E	
tdh	361	AAATCAGATCAAGTACAGCTTCAACATTGCTATAATCTGTAGCTAACTTTGTTGGTGAA	420
S67841.1	529	AAATCAGATCAAGTACAGCTTCAACATTGCTATAATCTGTAGCTAACTTTGTTGGTGAA	588
CDS:thermostable dir	121	K S D Q V Q L Q H S Y N S V A N F V G E	
CDS: Putative 1	141	D E D S I P S K M Y L D E T P E Y F V N	
tdh	421	GATGAAATTCATTCAGCTAAATGTATTGGATGAACTCCAGATATTTGTTAAAT	480
S67841.1	589	GATGAAATTCATTCAGCTAAATGTATTGGATGAACTCCAGATATTTGTTAAAT	648
CDS:thermostable dir	141	D E D S I P S K M Y L D E T P E Y F V N	
CDS: Putative 1	161	V E A Y E S G S G N I L V M C I S N K E	
tdh	481	GTAGAGCATATGAAAGTGGTACTGCTAATATTTGTAATGTGTATATCCACAAAGAA	540
S67841.1	649	GTAGAGCATATGAAAGTGGTACTGCTAATATTTGTAATGTGTATATCCACAAAGAA	708
CDS:thermostable dir	161	V E A Y E S G S G N I L V M C I S N K E	
CDS: Putative 1	181	S F F E C E H Q K *	
tdh	541	TCGTTTTTGAATGTGAACATCAAAAGTAA	570
S67841.1	709	TCGTTTTTGAATGTGAACATCAAAAGTAA	738
CDS:thermostable dir	181	S F F E C E H Q K *	

Hình 5. Mức độ tương đồng trình tự nucleotide giữa gen *tdh* đã phân lập và gen *tdh* được công bố trên GenBank (S67841.1) và amino acid suy diễn của nó (AAP14018.1)

3.4. Biểu hiện gen mã hóa tạo kháng nguyên độc tố bền nhiệt TDH

Plasmid tái tổ hợp pGEM/*tdh* được sử dụng làm khuôn mẫu thực hiện phản ứng PCR thu nhận gen mục tiêu với cặp mồi đặc hiệu như trình bày trên nhằm biểu hiện trong tế bào vật chủ *E. coli* BL21 (DE3) thông qua hệ thống biểu hiện là vector pET200/D-TOPO. Các khuẩn lạc dương tính mọc trên môi trường chọn lọc được chúng tôi tiến hành nuôi tăng sinh trên môi trường YJ lỏng có bổ sung kháng sinh (kanamycin, 100 µg/mL), tách chiết và tinh sạch plasmid tái tổ hợp, sau đó kiểm tra khả năng gắn gen *tdh* với cặp mồi đặc hiệu (hình 6).

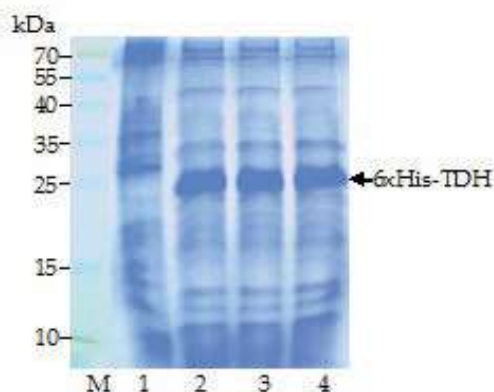


Hình 6. Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm plasmid pET200D/*tdh*

M: khối lượng thang chuẩn DNA (250 -10.000 bp, Promega), 1- 5: sản phẩm plasmid tái tổ hợp chứa gen *tdh* tách từ 5 khuẩn lạc

Phân tích trên gel cho thấy kết quả tách chiết DNA plasmid tái tổ hợp giữa các dòng khuẩn lạc khác nhau chọn lọc ngẫu nhiên đều cho một băng duy nhất, đậm, rõ nét và có kích thước khoảng 6.320 bp (bao gồm kích thước của vector là 5.741 bp, kích thước đoạn gen *tdh* là 570 bp và 4 nucleotide được thiết kế ở đầu 5' của mồi xuôi để tạo đầu định hướng khi gắn vào vector pET200/D-TOPO) tương đương với kích thước tính toán theo lý thuyết ban đầu (hình 6). Tế bào *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp sau khi được nuôi cảm ứng sinh với 1 mM IPTG ở 37°C, tốc độ lắc là 180 vòng/phút. Sự biểu hiện của gen mã hóa tạo kháng

nguyên độc tố bền nhiệt TDH được kiểm tra bằng chạy điện di trên gel polyacrylamide 15% có bổ sung SDS (hình 7).



Hình 7. Ảnh điện di thăm dò khả năng biểu hiện của gen *tdh*

M: khối lượng thang chuẩn protein (10–170 kDa, BioBase), 1: dịch protein thu được từ tế bào *E. coli* không mang vector tái tổ hợp, 2–4: dịch protein có chứa kháng nguyên độc tố bền nhiệt dung hợp 6xHis-TDH

IV. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã phân lập thành công vùng gen *tdh* mã hóa tạo kháng nguyên độc tố bền nhiệt của vi khuẩn *Vibrio* sp. gây bệnh xuất huyết lở loét trên cá hồng Mỹ nuôi lồng ven biển Thừa Thiên-Huế. Vùng gen mã hóa tạo kháng nguyên TDH có kích thước 570 bp, vùng gen này mã hóa tạo thành chuỗi peptide hoàn chỉnh và liên tục gồm 189 amino acid.

Trình tự gen *tdh* đã được biểu hiện trên hệ thống vector pET200/D-TOPO trong vật chủ *E. coli* BL21 (DE3) thu được protein dung hợp 6xHis-TDH có khối lượng phân tử khoảng 24,6 kDa. Băng protein này không nhận thấy ở tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) không mang gen *tdh*. Sản phẩm nghiên cứu của chúng tôi sẽ làm nguyên liệu để sản xuất vacxin/kháng thể sử dụng trong phòng trị bệnh xuất huyết lở loét trên cá hồng Mỹ do vi khuẩn *Vibrio* sp. gây ra.

Lời cảm ơn: Xin trân trọng cảm ơn Bộ Giáo dục và Đào tạo đã tài trợ cho nghiên cứu này thông qua đề tài khoa học công nghệ cấp Bộ, mã số CT-2018-DHH-05.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đinh Thị Bích Liên, Phùng Thăng Long, Huỳnh Văn Chương, Đặng Thanh Long, Hoàng Tấn Quảng, Lê Đức Thọ, Lê Quốc Việt, Lê Công Thịnh, Đặng Thị Hương, Hoàng Thị Thùy Nhung, 2016. Cải thiện mức độ biểu hiện kháng nguyên tái tổ hợp 3-1E của *Eimeria* trong *Escherichia coli* BL21. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*, Tập XXII,(7): p. 60–67.
- Chatterjee, S., Haldar S., 2012. *Vibrio* related diseases in aquaculture and development of rapid and accurate identification methods. *J Marine Sci Res Dev* 51:002.
- Egidius, E., 1987. Vibriosis: pathogenicity and pathology. *A review Aquaculture*, 67: p. 15–28.
- Fraser, C., Hanage, W.P., Spratt, B.G., 2007. Recombination and the nature of bacterial speciation. *Science*, 26: p. 476-480.
- Hendrikson, R.G., and Zenoble, R.D., 1983. Vibriosis in fish : a review. *Iowa State University Veterinarian*, 45: p. 25–28.
- John, K.R., and George, M.R., 2012. Viruses associated with epizootic ulcerative syndrome: an update. *Indian Journal of Virology*, 23(2): p. 106-13.
- Kumari, J. and Sahoo, P.K., 2006. Dietary beta-1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batrachus* L. *J. Fish Dis.*, 29: p. 95-101.
- Nishibuchi, M., Fasano, A., Russell, R.G. and Kaper, J.B., 1992. Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding Thermostable direct hemolysin. *Infection and Immunity*, 60: p. 3539-3545.
- Panicker, G., Call, D.R., Krug, M.J. and Bej, A.K., 2004. Detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12): p. 7336 - 7444.
- Shinoda, S., 1999. Protein toxins produced by pathogenic *Vibrios*. *Journal of natural toxins* 8: p. 259–269.
- Subasinghe, R.P., Bondad-Reantaso, M.G., McGladdery, S.E., 2001. Aquaculture development, health and wealth. In: *Aquaculture in the third millennium. Technical proceedings of the Conference on aquaculture in the third millennium*. Rome, Italy: NACA. Bangkok and FAO: p. 167-191.
- Takahashi, A., Sato, Y., Shiomi, Y., Cantarelli, V.V., Iida, T., Lee, M. and Honda, T., 2000. Mechanisms of chloride secretion induced by thermostable direct haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* in human colonic tissue and a human intestinal epithelial cell line. *J. Med. Microbiol*, 49: p. 801–810.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. and Rozen, S.G., 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic acids Research*, 1; 40(15), e115.
- Zhang, X.H., Austin, B., 2005. Haemolysins in *Vibrio* species. *Journal of Applied Microbiology*, 98: p. 1011–1019.

Ngày nhận 12-4-2020

Ngày phản biện 1-6-2020

Ngày đăng 1-11-2020