

TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA KHÁNG NGUYÊN ENGAM22 CỦA *EIMERIA NECATRIX* TRONG *E. COLI* BL21 (DE3)

Lê Việt Quân², Đồng Hữu Rin², Đặng Thị Hương²,
Đinh Thị Bích Lan², Phùng Thăng Long¹

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tạo dòng và biểu hiện thành công đoạn gen mã hóa kháng nguyên Engam22 của *Eimeria necatrix* phân lập từ mẫu phân gà thu thập tại tỉnh Thừa Thiên - Huế, Việt Nam. Đoạn gen mã hóa cho kháng nguyên Engam22 được tạo dòng vào plasmid pGEM®-T Easy, sau đó được biểu hiện bởi vector pET200/D-TOPO trong tế bào *Escherichia coli* BL21 (DE3). Kết quả nghiên cứu cho thấy đoạn gen mã hóa kháng nguyên Engam22 có chiều dài 505 bp, mã hóa một chuỗi polypeptide dài 167 amino acid, và tương đồng 100% so với trình tự chuỗi polypeptide của kháng nguyên Engam22 đã được công bố trên GenBank (mã số AHB64327.1). Kết quả điện di trên SDS-PAGE cho thấy protein tái tổ hợp 6xHis-Engam22 có khối lượng phân tử khoảng 25 kDa.

Từ khóa: Bệnh cầu trùng, *Eimeria necatrix*, Engam22, tạo dòng và biểu hiện, protein tái tổ hợp.

Cloning and expression of gene encoding Engam22 antigen of *Eimeria necatrix* in *E. coli* BL21 (DE3)

Le Viet Quan, Dong Huu Rin, Dang Thi Huong,
Dinh Thi Bích Lan, Phung Thang Long

SUMMARY

In this study, we successfully cloned and expressed a fragment of gene encoding Engam22 antigen of *Eimeria necatrix* isolated from the fecal samples of chickens raised in Thua Thien - Hue province, Viet Nam. The fragment of gene encoding Engam22 antigen was cloned into plasmid pGEM®-T Easy and expressed with vector pET200/D-TOPO in *Escherichia coli* BL21(DE3) cells. The studied results showed that the nucleotide sequence of fragment of gene encoding Engam22 antigen was 505 bp in length, encoding a polypeptide chain with 167 amino acid residues, and 100% similarity to the polypeptide chain of Engam22 antigen in GenBank (accession number: AHB64327.1). The results of SDS-PAGE analysis showed that molecular weight of 6xHis-Engam22 recombinant protein was about 25 kDa.

Keywords: Coccidiosis, *Eimeria necatrix*, Engam22, cloning and expression, recombinant protein.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh cầu trùng (*Coccidiosis*) là một trong những bệnh truyền nhiễm nguy hiểm ở gia cầm, có mặt trên toàn thế giới, trong đó có Việt Nam [1, 2, 9]. Bệnh có khả năng lây lan nhanh, tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ chết cao ở gà con. Gà nhiễm bệnh sẽ bị còi cọc, giảm tốc độ sinh trưởng, giảm chất lượng thịt, sản lượng trứng ở gà mái đẻ và tăng tiêu tốn thức ăn [7, 9].

Hiện nay có nhiều loài *Eimeria* gây bệnh trên gà, trong đó có 7 loài gây bệnh chủ yếu: *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria praecox* và *Eimeria mitis* [2, 6]. Mỗi một loài *Eimeria* khác nhau có vị trí gây bệnh khác nhau trong đường tiêu hóa của gà [2, 9].

Eimeria necatrix (*E. necatrix*) là một trong những loài cầu trùng gây tỷ lệ chết cao ở gia cầm, chủ yếu ở gà trên 8 tuần tuổi [8, 9]. Trong vòng đời của *E. necatrix*, thể hệ meront thứ nhất và thứ hai ký sinh ở ruột non, oocysts ký sinh ở manh tràng [9]. Hiện nay

¹Trường Đại học Nông Lâm - Đại học Huế

² Công ty TNHH MTV TMDV và SX Minh Nhật Việt

để phòng trị bệnh cầu trùng, người chăn nuôi chủ yếu dùng kháng sinh bổ sung vào trong thức ăn và nước uống. Tuy nhiên phương pháp này còn nhiều hạn chế như: việc sử dụng kháng sinh kéo dài sẽ dẫn đến xuất hiện một số chủng *Eimeria* có khả năng kháng kháng sinh [5], tồn dư kháng sinh trong thực phẩm làm ảnh hưởng đến sức khỏe của người tiêu dùng. Vì vậy cần có chế phẩm sinh học thay thế kháng sinh trong phòng trị bệnh do *E. necatrix* gây ra ở gia cầm.

Protein Engam22 là một loại kháng nguyên gametocyte, có liên quan đến sự hình thành oocysts ở một số loài *Eimeria* và có khả năng gây đáp ứng miễn dịch cao [8]. Kháng nguyên Engam22 tái tổ hợp (rEngam22) đã được chứng minh có kết hợp đặc hiệu với kháng thể trong huyết thanh gà được gây nhiễm bởi *E. necatrix*, *E. maxima* và *E. tenella*. Hơn nữa, kháng thể đặc hiệu kháng rEngam22 có thể nhận biết được macrogametocytes, oocysts và sporocysts của *E. necatrix* [8]. Do đó, kháng nguyên Engam22 tái tổ hợp có thể được sử dụng để phát triển vaccin và kháng thể dùng trong phòng trị bệnh cầu trùng do *E. necatrix* gây ra ở gà.

Trong thời gian từ 10/2019 đến 3/2021 chúng tôi đã phân lập đoạn gen mã hóa kháng nguyên Engam22 của *E. necatrix* từ phân gà bị nhiễm cầu trùng, tạo dòng và biểu hiện trong tế bào *E. coli* BL21 để tạo kháng nguyên tái tổ hợp rEngam22.

II. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- Các mẫu phân của gà nghi bị nhiễm cầu trùng
- Các loại môi trường LB, YJ
- Kháng sinh ampicillin, kanamycin; agarose, chất cảm ứng IPTG
- Đệm TAE có thành phần: 40 mM Tris (pH = 7.6), 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA
- Kit tách chiết ARN (SV Total RNA Isolation System, Promega), tổng hợp cDNA (RevertAid First Strand cDNA Synthesis, Thermo-Scientific), DNA Plasmid Extraction (ABT), tinh sạch ADN (EZ-10 Spin Column ADN Gel Extraction Minipreps KIT, Biobasic), tinh sạch protein (kit ProBond™ Purification System, Thermo Fisher Scientific, USA)

- Vector pGEM® -T Easy (Promega), Vector pET200/D-TOPO (Invitrogen, Hoa Kỳ)

- Tế bào *E. coli* TOP10, tế bào *E. coli* BL21 (DE3).

2.2. Nội dung nghiên cứu

- Thu thập mẫu, tách oocysts và xác định mẫu phân có nhiễm *E. necatrix*

- Phân lập và tạo dòng đoạn gen mã hóa kháng nguyên Engam22

- Gắn đoạn gen mã hóa kháng nguyên Engam22 vào vector pET200/D-TOPO và biểu hiện trong *E. coli* BL21(DE3)

- Xác định protein tái tổ hợp 6xHis-Engam22 bằng phương pháp ELISA.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Tách oocysts cầu trùng

Oocysts của *Eimeria* được phân lập từ mẫu phân gà nghi bị nhiễm cầu trùng trên đĩa bông thấm Thừa Thiên-Huế theo phương pháp phù nổi (Fülleborn), kết hợp với phương pháp lắng cận của Darling; sau đó soi dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 40x để khẳng định sự có mặt của cầu trùng. Dịch thu được từ phương pháp phù nổi được xử lý với chất diệt khuẩn NaClO 5,7% sau đó được rửa lại 2 lần bằng nước cất vô trùng và một lần với phosphate buffer saline 1X (PBS 1X), và quan sát dưới kính hiển vi [1].

2.3.2. Tách ADN tổng số và PCR xác định cầu trùng *E. necatrix*

Ly tâm 1ml oocysts để thu oocyst và tái huyền phù trong 350µl dung dịch lysis (600 mM EDTA, 1,3% N-lauroylsarcosine, pH: 9,5), trộn đều (vortex), sau đó bổ sung một khối lượng tương đương hạt thủy tinh (0,1 mm) vortex mạnh trong 5 phút, Bổ sung proteinase K cho đạt nồng độ 2 mg/ml, và ủ ở 65°C trong 75 phút. Bổ sung 350 µl dung dịch cetyl-trimethyl ammonium bromide (CTAB) buffer [2% (w/v) CTAB; 1,4 M NaCl; 0,2% β-mercaptoethanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH: 8,0] vào huyền dịch trên, vortex và tiếp tục ủ ở 60°C trong 1 giờ. Ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút thu dịch nổi chuyển qua ống eppendorf mới.

Bổ sung một thể tích tương đương của phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25: 24: 1) vào dịch nổi

trên, trộn đều, ly tâm 15.000 vòng/phút trong 15 phút, thu dịch nổi chuyển qua ống eppendorf mới. ADN tổng số được kết tủa với 2 thể tích của ethanol 100% lạnh, ủ ở -20°C trong 30 phút, ly tâm 15.000 vòng/phút trong 15 phút loại bỏ dịch nổi. Tủa ADN được rửa với 70% ethanol lạnh, ly tâm 12.000 vòng/phút trong 5 phút (lặp lại 3 lần). Cuối cùng phần kết tủa được hòa tan bằng 50 µl dung dịch TE (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH: 7,2) hoặc nước cất vô trùng, ADN được bảo quản -20°C cho đến khi tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Để xác định sự có mặt của cầu trùng *E. necatrix*, ADN tổng số được sử dụng làm khuôn mẫu để thực hiện phản ứng PCR theo Carvalho và cs. [4] với cặp mồi chỉ thị có trình tự như sau:

Mồi xuôi: Ne.F 5'-TTCATTTTCGCT-TAACAATATTTGGCCTCA-3'

Mồi ngược: Ne.R 5'-ACAACGCCTCAT-AACCCCAAGAAATTTTG-3',

2.3.3. Phân lập và tạo dòng đoạn gen mã hóa kháng nguyên Engam22

- Tách chiết ARN tổng số và tổng hợp sợi cDNA thứ nhất

ARN tổng số của cầu trùng gà *Eimeria* được tách chiết bằng kit SV Total RNA Isolation System (Promega). Sợi cDNA thứ nhất được tổng hợp dựa trên kit First Strand cDNA Synthesis theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Phân lập đoạn gen mã hóa kháng nguyên Engam22

Sợi cDNA thứ nhất sau khi được tổng hợp sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR phân lập gen mã hóa tạo kháng nguyên Engam22 với cặp mồi đặc hiệu được tham khảo theo Liu (2014) có chỉnh sửa để phù hợp với vector biểu hiện pET/D-TOPO, gắn thêm trình tự CACC ở đầu 5' của mồi xuôi bổ sung cho trình tự GTGG trong vector giúp tạo dòng định hướng cho sản phẩm PCR. Thành phần nucleotide của mồi xuôi và mồi ngược như sau:

Mồi xuôi (Engam22.F): 5'-CACCATGGAC-GAAGCACCTGAGT-3'

Mồi ngược (Engam22.R): 5'-GCGCTTAGTT-GATGTCGGTAA-3'

Thành phần phản ứng PCR bao gồm: 25 µl 2X Go taq green master Mix, 2 µl mồi xuôi (10 pmol/µl), 2 µl mồi ngược (10 pmol/µl), 2 µl cDNA và 19 µl nước tinh khiết. PCR được thực hiện với chu trình luân nhiệt như sau: biến tính genome 95°C/5 phút, tiếp đến là 30 chu kỳ: 95°C/60 giây, 56°C/45 giây và 72°C/45 giây, cuối cùng là 72°C/5 phút.

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 1% trong đệm TAE 1X ở 100 V trong 35 phút. Gel sau khi điện di được nhuộm bằng Ethidium bromide nồng độ 0,5 µg/ml trong thời gian 15 phút trên máy lắc nhẹ. Gel được quan sát và chụp ảnh dưới ánh sáng tử ngoại.

- Tạo dòng đoạn gen mã hóa kháng nguyên Engam22

Sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch bằng kit EZ-10 Spin Column ADN Gel Extraction Minipreps (Biobasic) sẽ được gắn vào vector pGEM®-T Easy theo phương pháp dòng hóa TA (TA-cloning), có enzyme T₄ ADN ligase làm enzyme gắn.

Thành phần phản ứng gắn bao gồm: 1 µl vector pGEM®-T Easy (50 ng/µl), 5 µl 2X Rapid Ligation Buffer, 1 µl T4 DNA ligase (3 đơn vị/µl), 1 µl (15 ng/µl) sản phẩm PCR đã được tinh sạch, sau đó bổ sung nước cất vô trùng để đạt thể tích cuối cùng 10 µl, phản ứng được ủ ở 25°C trong 3 giờ.

Sản phẩm plasmid tái tổ hợp (sản phẩm gắn) được biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10 bằng phương pháp sốc nhiệt ở 42°C trong 45 giây và lập tức chuyển vào ủ đá lạnh trong 3 phút, thêm 950 µl môi trường dinh dưỡng LB vào hỗn hợp trên. Toàn bộ hỗn hợp này được lắc 150 vòng/phút ở 37°C trong 1 giờ để vi khuẩn tái tổ hợp phát triển. Sau đó hút 100 µl mẫu trải đều trên đĩa thạch môi trường LB chọn lọc có chứa 120 µl X-gal (20 mg/ml), 100 µl IPTG 0,1M và 100 µg/ml ampicillin. Chờ đến khi khô thạch đem nuôi ở tủ 37°C trong 16 giờ, sau đó tiến hành chọn lọc khuẩn lạc trắng và nuôi cấy vi khuẩn tái tổ hợp.

Các khuẩn lạc dương tính (khuẩn lạc màu trắng) được kiểm tra sự hiện diện của gen Engam22 bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu (Engam22) và cặp mồi M13 (M13F: 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' và M13R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') được thiết kế sẵn trên vector pGEM®-T Easy.

Các dòng khuẩn lạc dương tính với sản phẩm PCR được nuôi tăng sinh trong ống nghiệm chứa 5 ml môi trường LB có bổ sung 100 µg/ml kháng sinh ampicillin, nuôi ở 37°C qua đêm. Thu sinh khối tế bào và tiến hành tách chiết, tinh sạch ADN plasmid tái tổ hợp bằng DNA plasmid extraction kit (ABT, Việt Nam).

ADN plasmid tái tổ hợp được gửi đi giải trình tự gen tại Công ty TNHH MTV Sinh hóa Phú sa. Kết quả giải trình tự nucleotide của gen được phân tích bằng phần mềm BioEdit và so sánh mức độ tương đồng với trình tự đã được công bố trên GenBank.

2.3.4. Gắn đoạn gen mã hóa kháng nguyên Engam22 vào vector pET200/D-TOPO và biểu hiện trong *E. coli* BL21(DE3)

Vector tái tổ hợp pGEM®-TEasy/Engam22 được sử dụng làm khuôn mẫu để thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu được thiết kế có gắn thêm trình tự CACC vào ở đầu 5' của mồi xuôi giúp tạo dòng định hướng cho sản phẩm PCR trong vector này. Thành phần phản ứng PCR gồm có 1 µl vector tái tổ hợp pGEM®-TEasy/Engam22 (50 ng), 1 µl mồi xuôi Engam22.F (10 pmol/µl), 1 µl mồi ngược Engam22.R (10 pmol/µl), 5 µl 10 mM hỗn hợp dNTP, 1 µl Velocity DNA polymerase (10 pmol/µl) (Bioline, Anh), 10 µl 5x Hi-Fi Reaction Buffer, nước cất vô trùng vừa đủ 50 µl với chu trình nhiệt như đã mô tả ở trên.

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di agarose gel 1% với thuốc nhuộm ethidium bromide (0,5 µg/l).

Sau đó, sản phẩm PCR được gắn vào vector pET200/D-TOPO với thành phần phản ứng gắn bao gồm 1 µl sản phẩm PCR (10 ng), 1 µl vector pET200 (20 ng/µl), 1 µl đệm gắn, nước cất vô trùng để đạt thể tích gắn là 6 µl. 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 sốc nhiệt ở 42°C trong 45 giây. Tế bào biến nạp sau đó được trải đều trên đĩa petri chứa môi trường LB đặc có bổ sung 100 µg/ml kanamycin và nuôi ở 37°C qua đêm. Các dòng tế bào mang vector tái tổ hợp được chọn lọc bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu để kiểm tra sự

có mặt của gen *Engam22* trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3).

Các tế bào *E. coli* BL21 (DE3) có chứa vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên *Engam22* (pET200/D-TOPO/Engam22) được nuôi trong 50 ml môi trường YJ có bổ sung 100 µg/ml kanamycin ở 37°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Khi mật độ tế bào của dịch nuôi cấy ở bước sóng 600 nm đạt tới 1,0 ($OD_{600} = 1,0$) thì bổ sung 40 µl chất cảm ứng IPTG 1M (hãng Bio-Rad) và tiếp tục nuôi ở 25°C trong 12 tiếng, tốc độ lắc 150 vòng/phút. Sinh khối được thu bằng phương pháp ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 10 phút và tách chiết protein tổng số bằng cách 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, sau đó xử lý với sóng siêu âm trong 5 phút. Ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút để thu lấy protein thể dịch. Tiếp tục hòa tan phần kết tủa với dung dịch Urea 8M, ủ ở 30°C trong 1 giờ, sau đó ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút để thu lấy protein trong thể vùi. Protein dung hợp 6xHis-Engam22 được tinh sạch từ protein tổng số bằng kit ProBond™ Purification System (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sự biểu hiện protein của đoạn gen mã hóa kháng nguyên Engam22 trong *E. coli* BL21(DE3) được đánh giá bằng phương pháp điện di SDS-PAGE.

2.3.5. Xác định protein tái tổ hợp 6xHis-Engam22 bằng phương pháp ELISA

Sự có mặt của protein tái tổ hợp 6xHis-Engam22 được xác định bằng kháng thể HRP Anti-6X His tag® (Abcam, Anh Quốc). Cụ thể như sau:

- Protein đã tinh sạch được pha loãng thành nồng độ 20 µg/ml trong đệm Carbonate-bicarbonate buffer (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ), phủ lên đĩa ELISA với lượng 50 µl/giếng và ủ ở 4°C trong 16 giờ.

- Loại bỏ dịch và rửa giếng ELISA 2 lần với đệm PBS-T (đệm PBS có bổ sung 0,1% Tween 20). Sau đó bổ sung vào mỗi giếng 200 µl skim milk 5%, ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ.

- Loại bỏ dịch và rửa giếng ELISA 2 lần với đệm

PBS-T. Bổ sung 100µl kháng thể HRP Anti-6X His tag® (Abcam, Anh Quốc) đã được pha loãng theo tỷ lệ 1:500 trong PBS, ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ.

- Loại bỏ dịch và rửa với đệm PBS-T. Bổ sung mỗi giếng 100 µl cơ chất TMB ELISA (Abcam, Anh Quốc), ủ trong 10 phút

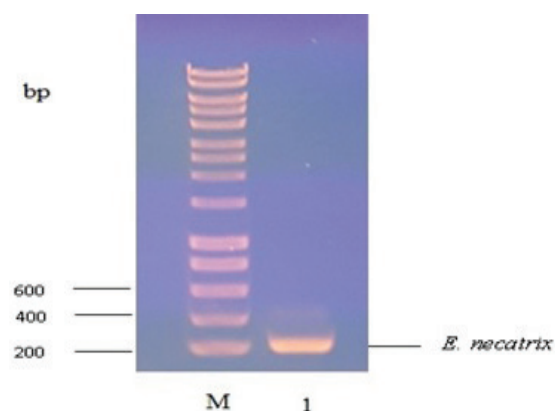
- Bổ sung 100 µl dung dịch dừng phản ứng (Abcam, Anh Quốc) vào mỗi giếng và đọc kết quả.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thu oocysts và xác định *E. necatrix*

Oocysts của cầu trùng được thu theo phương pháp phù nổi và lắng cặn (mẫu tươi). Dịch phù nổi được soi qua kính hiển vi với độ phóng đại 40x để phát hiện oocysts.

Sau khi tách ADN từ oocysts, chúng tôi sử dụng phương pháp PCR để xác định những mẫu nhiễm cầu trùng *E. necatrix*. Kết quả điện di sản phẩm PCR được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR với cặp mồi chỉ thị cho *E. necatrix*

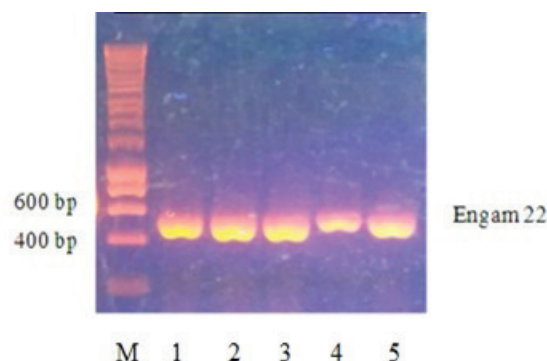
M: Marker HyperLadder™ 1kb (Bioline); 1: Sản phẩm PCR từ ADN mẫu thu được

3.2. Kết quả phân lập đoạn gen mã hóa kháng nguyên Engam22 của *E. necatrix*

ARN tổng số sau khi tách chiết sẽ được sử dụng cho phản ứng phiên mã ngược tạo tiền cDNA và sử dụng cho phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu để phân lập đoạn gen mã hóa kháng nguyên Engam22.

Kết quả điện di (hình 2) cho thấy sản phẩm

PCR có một băng duy nhất, rõ nét, nồng độ cao, với kích thước vào khoảng 500bp, phù hợp kích thước tính toán ban đầu của gen *Engam22*.



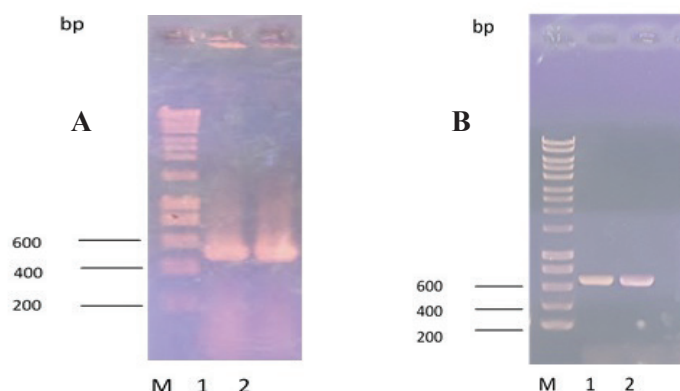
Hình 2. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu cho đoạn gen mã hóa kháng nguyên Engam22

M: Marker HyperLadder™ 1kb (Bioline); 1, 2, 3, 4, 5: Sản phẩm PCR từ ADN của mẫu thu được

3.3. Kết quả tạo dòng gen mã hóa kháng nguyên Engam22 của *E. necatrix*

Sản phẩm PCR được tinh sạch từ gel agarose và được gắn vào vector pGEM® T- Easy. Tiến hành biến nạp sản phẩm gắn chứa plasmid pGEM® T- Easy/Engam22 vào tế bào *E. coli* TOP10. Kết quả biến nạp thu được hai dòng khuẩn lạc xanh và trắng. Chọn các khuẩn lạc trắng để làm PCR với cặp mồi đặc hiệu của gen *Engam22* và cặp mồi M13 của vector pGEM®-T Easy để kiểm tra sự hiện diện của đoạn gen mã hóa kháng nguyên.

Kết quả ở hình 3A cho thấy đã xuất hiện băng ADN đúng với kích thước phân lập ban đầu (khoảng 505 bp) đối với cặp mồi đặc hiệu. Với cặp mồi M13, sản phẩm PCR thu được có kích thước khoảng 700 bp. Kích thước này bao gồm kích thước của gen và một đoạn khoảng 200 bp nằm trên vector pGEM®-T Easy do primer M13 khuếch đại (hình 3B). Kết quả này chỉ ra rằng, gen *Engam22* đã được gắn thành công vào vector pGEM® -T Easy và vector pGEM®-T Easy/Engam22 đã được biến nạp thành công vào tế bào *E. coli* Top10 khả biến.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định sự có mặt của plasmid tái tổ hợp pGEM®-T Easy/Engam22 trong tế bào *E. coli* Top 10 với cặp mồi đặc hiệu

M: Marker HyperLadder™ 1kb (Bioline) ; 1, 2: Sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu gen Engam22 (A) và cặp mồi M13 (B)

Các dòng khuẩn lạc cho kết quả PCR dương tính được nuôi trong môi trường LB để tiến hành tách plasmid tái tổ hợp và giải trình tự. Kết quả giải trình tự cho thấy đoạn gen mã hóa cho kháng

nguyên *Engam22* phân lập được có độ dài 507 bp, có độ tương đồng cao (100%) với đoạn gen mã hóa cho kháng nguyên *Engam22* đã được công bố trên GenBank (mã số KF649255.1) (hình 4).

Engam22	38	GACGAAGCACCTGAGTATCCTTCTCAGCTTGCAAGTTCGATCCAGAAGCGATTATT	97
KF649255	136	GACGAAGCACCTGAGTATCCTTCTCAGCTTGCAAGTTCGATCCAGAAGCGATTATT	195
Engam22	98	GCGATCCAGCAAGATGCAAACGCCGACCCACGTCTCTTTTTTCCCACTGAGCGGGCTTGTC	157
KF649255	196	GCGATCCAGCAAGATGCAAACGCCGACCCACGTCTCTTTTTTCCCACTGAGCGGGCTTGTC	255
Engam22	158	TCCGCCAAACTTGTCAAAGTCTTTCAACCCAACATATACCCAACCCCTCCTAATCCCCAG	217
KF649255	256	TCCGCCAAACTTGTCAAAGTCTTTCAACCCAACATATACCCAACCCCTCCTAATCCCCAG	315
Engam22	218	ACAACCTTACCACTTTCACCTCCATCCTCATCCCCATTATCCGCATCCTCAGCCAAATTAT	277
KF649255	316	ACAACCTTACCACTTTCACCTCCATCCTCATCCCCATTATCCGCATCCTCAGCCAAATTAT	375
Engam22	278	CCTCATCCCCATTCTCATCCTCATCCCCATCATCCTCATCCTCATCCCCATCAACATCCT	337
KF649255	376	CCTCATCCCCATTCTCATCCTCATCCCCATCATCCTCATCCTCATCCCCATCAACATCCT	435
Engam22	338	CATCCTCATTCGACCATCATCCCCACCATCATCCTCACCATCATGAACATACTGTTTAT	397
KF649255	436	CATCCTCATTCGACCATCATCCCCACCATCATCCTCACCATCATGAACATACTGTTTAT	495
Engam22	398	GTGCCTCAACATCAGCAGCTCAACACAACGGCCACCAGAACCAGGTGGCCGAGCTCAT	457
KF649255	496	GTGCCTCAACATCAGCAGCTCAACACAACGGCCACCAGAACCAGGTGGCCGAGCTCAT	555
Engam22	458	TATCACCATGACTACCATTTTGCATCCTCATCAAGAGAACCAGCATCACCGCGAGGAA	517
KF649255	556	TATCACCATGACTACCATTTTGCATCCTCATCAAGAGAACCAGCATCACCGCGAGGAA	615
Engam22	518	GAGCAGCTTACCGACATCAACTAAG	542
KF649255	616	GAGCAGCTTACCGACATCAACTAAG	640

Hình 4. Mức độ tương đồng của trình tự nucleotide giữa đoạn gen mã hoá kháng nguyên Engam22 phân lập được với đoạn gen mã hoá kháng nguyên Engam22 đã được công bố trên GenBank (mã số KF649255.1)

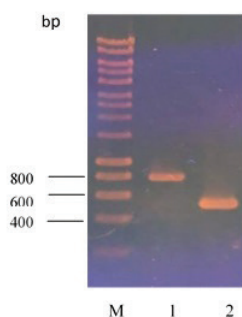
Engam22 1	DEAPEYPSQLAVEIDPEAIIIAIQQDANADPRLFFFLSGLVSAKLKVFQPNIIYPTFPNPQ	60
AHB64327 20	DEAPEYPSQLAVEIDPEAIIIAIQQDANADPRLFFFLSGLVSAKLKVFQPNIIYPTFPNPQ	79
Engam22 61	TTYHFHLHPHPHYHPQPNYPHPHSHPHPHHPHPHQHPHPSDHHPHHHHPHHHEHTVH	120
AHB64327 80	TTYHFHLHPHPHYHPQPNYPHPHSHPHPHHPHPHQHPHPSDHHPHHHHPHHHEHTVH	139
Engam22121	VPQHQAQHNHGHQNHGGPAHYHHDYHFAHHPQENQHHRREEEQLTIDIN	167
AHB64327 140	VPQHQAQHNHGHQNHGGPAHYHHDYHFAHHPQENQHHRREEEQLTIDIN	186

Hình 5. Mức độ tương đồng của trình tự amino acid suy diễn của đoạn gen mã hoá kháng nguyên Engam22 phân lập được và trình tự amino acid của đoạn gen mã hoá kháng nguyên Engam22 đã được công bố trên GenBank (mã số AHB64327.1)

Kết quả phân tích cho thấy trình tự nucleotide phân lập được mã hóa một đoạn gồm 167 amino acid, có độ tương đồng 100% so với trình tự được công bố trên GenBank (mã số AHB64327.1), trình tự amino acid liên tục, không có codon stop chen vào giữa.

3.3. Biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên Engam22 trong tế bào *E.coli* BL21 (DE3)

Đoạn gen mã hóa kháng nguyên Engam22 được tách từ vector pGEM®-T Easy/Engam22 bằng phản ứng PCR với cặp mồi Engam22.F và Engam22.R, sau đó được tạo dòng trong vector pET200/D-TOPO và biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21(DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt. Kết quả điện di kiểm tra sự có mặt của các khuẩn lạc dương tính mang gen mã hóa kháng nguyên Engam22 được trình bày ở hình 6.



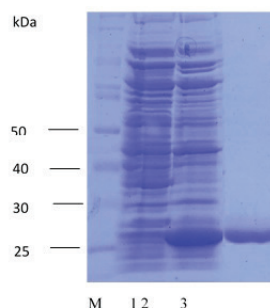
Hình 6. Kết quả PCR kiểm tra gen Engam22 từ khuẩn lạc BL21

M: Marker HyperLadder™ 1kb (Bioline), 1: Khuẩn lạc dương tính được kiểm tra bằng cặp mồi T7, 2: Khuẩn lạc dương tính được kiểm tra bằng cặp mồi đặc hiệu của gen Engam22

Kết quả điện di cho thấy khuẩn lạc được kiểm tra có kết quả PCR dương tính, bằng ADN khuếch

đại có kích thước khoảng 500 bp khi thực hiện PCR với cặp mồi đặc hiệu và khoảng 700 bp khi thực hiện PCR với cặp mồi T7. Điều này chứng tỏ gen mã hóa kháng nguyên Engam22 đã được tạo dòng thành công vào vector pET200/D-TOPO trong tế bào *E. coli* BL21.

Sự biểu hiện protein Engam22 tái tổ hợp ở *E. coli* BL21(DE3) trong môi trường YJ (có IPTG và không có IPTG) được kiểm tra trên gel polyacrylamide 15% có chứa SDS (hình 7).



Hình 7. Điện di SDS-PAGE đánh giá khả năng biểu hiện protein tái tổ hợp 6x-His-Engam22 trong *E. coli* BL21 (DE3)

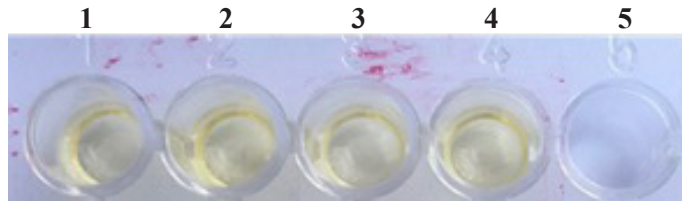
M : Marker 10-200 kDa (Bio basic); 1: protein dịch nổi từ tế bào *E. coli* mang vector tái tổ hợp, không cảm ứng bằng IPTG; 2: protein thể vùi thu được từ tế bào *E. coli* mang vector tái tổ hợp được cảm ứng bằng IPTG; 3: Protein dung hợp 6xHis-Engam22 tái tổ hợp sau tinh sạch.

Theo tính toán, kích thước protein tái tổ hợp được biểu hiện sẽ có khối lượng phân tử khoảng 23,2kDa, bao gồm kích thước Engam22 là 19,5 kDa và đuôi dung hợp của vector pET200/D-TOPO có khối lượng phân tử khoảng 3,7 kDa. Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy protein Engam22 có khối lượng khoảng 27 kDa, lớn hơn so với kích thước lý thuyết.

Theo Belli và cs. (2003), hiện tượng này có thể là do một thành phần amino acid bất thường [3], kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên Engam22 của Liu và cs. [8].

3.5. Xác định protein tái tổ hợp 6xHis-Engam22 bằng phương pháp ELISA trực tiếp

Kết quả ELISA trực tiếp (hình 8) cho thấy protein đã tinh sạch có liên kết đặc hiệu với kháng thể HRP Anti-6X His tag® (Abcam, Anh Quốc). Điều này chứng tỏ rằng protein được sản xuất trong *E. coli* BL21 chính là protein tái tổ hợp Engam22 có đuôi dung hợp 6xHis.



Hình 8. Kết quả ELISA xác định protein tái tổ hợp 6xHis-Engam22

1: Đối chứng dương (giếng được phủ với protein P102 tinh sạch); 2, 3, 4 : Giếng được phủ với protein Engam22 tinh sạch; 5: Đối chứng âm, giếng được phủ với Urea 8M

IV. KẾT LUẬN

Đoạn gen mã hóa cho kháng nguyên Engam22 của *E. necatrix* đã được tạo dòng và biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3). Đoạn gen có chiều dài 507 bp, tương đồng 100% so với trình tự đoạn gen mã hóa kháng nguyên Engam22 đã được công bố trên GenBank (mã số KF649255.1) và mã hóa tạo chuỗi polypeptide dài 167 amino acid, có độ tương đồng 100% với trình tự công bố trên GenBank (mã số AHB64327.1). Kết quả tinh sạch và điện di SDS-PAGE cho thấy protein tái tổ hợp 6xHis-Engam22 có khối lượng phân tử khoảng 27 kDa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đinh Thị Bích Lân, Phùng Thăng Long, Đặng Thanh Long, Huỳnh Văn Chương, Hoàng Tấn Quảng, Lê Quốc Việt, Lê Đức Thọ, Lê Công Thịnh, Trần Thị Việt Luân, 2015. Tạo dòng và biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên 3-IE từ *Eimeria* được phân lập tại Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*, Tập XII, số 7, trang 60-67.
- Allen PC, Fetterer RH, 2002. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clin Microbiol Rev* 2002, 15(1):58–65.
- Belli, S. I., Wallach, M. G., & Smith, N. C., 2003. Cloning and characterization of the 82 kDa tyrosine-rich sexual stage glycoprotein, GAM82, and

its role in oocyst wall formation in the apicomplexan parasite, *Eimeria maxima*. *Gene*, 307, 201–212.

- Carvalho F. S., A. A. Wenceslau, M. Teixeira and G. R. Albuquerque, 2010. Molecular diagnosis of *Eimeria* species affecting naturally infected *Gallus gallus*. *GMR Genetics and Molecular research*. Vol 10. pp. 996-1005.
- Chapman H. D., 1997. Biochemical genetic and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. *Avian Pathol*. Vol 26 (2). pp. 222 -224.
- Dalloul RA, Lillehoj HS, 2006. Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. *Expert Rev Vaccine* 2006, 5(1):143–163.
- Lillehoj HS, Lillehoj EP., 2000. Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian Dis* 2000, 44(2):408–425.
- Liu, D., Cao, L., Zhu, Y., Deng, C., Su, S., Xu, J., Tao, J., 2014. Cloning and characterization of an *Eimeria necatrix* gene encoding a gametocyte protein and associated with oocyst wall formation. *Parasites & Vectors*, 7(1), 27.
- Long PL, 1982. *The biology of the coccidia* (1982). Baltimore, MD: University Park Press.

Ngày nhận 8-6-2021

Ngày phản biện 15-7-2021

Ngày đăng 1-3-2022