

TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA KHÁNG NGUYÊN GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (GAPDH) CỦA *EDWARDSIELLA ICTALURI* TRONG *E. COLI* BL21 (DE3)

*Phùng Thăng Long¹, Lê Việt Quân², Đồng Hữu Rin²,
Lê Việt Tuấn Khanh¹, Đinh Thị Bích Lân²*

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tạo dòng và biểu hiện thành công gen mã hóa protein kháng nguyên Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) của *Edwardsiella ictaluri* phân lập từ mẫu cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bị nhiễm bệnh gan thận mủ ở tỉnh An Giang, Việt Nam. Gen mã hóa cho kháng nguyên GAPDH được tạo dòng vào vector pGEM®-T Easy, sau đó được biểu hiện bởi vector pET200/D-TOPO trong tế bào *Escherichia coli* BL21 (DE3). Kết quả giải trình tự cho thấy gen *GAPDH* của *Edwardsiella ictaluri* có chiều dài 996 bp, mã hóa một chuỗi polypeptide dài 331 amino acid, liên tục, và tương đồng 99% so với trình tự chuỗi polypeptide của kháng nguyên GAPDH đã được công bố trên Ngân hàng Gen (GenBank) (mã số AVZ80933.1). Kết quả điện di protein được biểu hiện trên gel sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) 15% cho thấy protein dung hợp trong thể vùi có khối lượng phân tử khoảng 39 kDa, và ELISA trực tiếp khẳng định rằng protein được biểu hiện là protein kháng nguyên tái tổ hợp 6xHis-GAPDH.

Từ khóa: Bệnh gan thận mủ, *Edwardsiella ictaluri*, GAPDH, tạo dòng và biểu hiện, protein tái tổ hợp.

Cloning and expression of gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antigen of *Edwardsiella ictaluri* in *E. coli* BL21 (DE3)

*Phung Thang Long, Le Viet Quan, Dong Huu Rin,
Le Viet Tuan Khanh, Dinh Thi Bich Lan*

SUMMARY

In this study, we successfully cloned and expressed the gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antigen protein of *Edwardsiella ictaluri* isolated from tissue samples of bacillary necrosis diseased striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in An Giang province, Viet Nam. The gene encoding GAPDH antigen was cloned into vector pGEM®-T Easy and expressed with vector pET200/D-TOPO in *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells. The results of sequencing showed that the nucleotide sequence of *GAPDH* gene was 996 bp in length, encoding a polypeptide with 331 amino acid residues, and 99% similarity to the polypeptide chain of recorded GAPDH antigen in GenBank (accession number: AVZ80933.1). The result of expressed protein analysis on 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) gel showed that molecular mass of fusion protein was approximately 39 kDa, and direct ELISA determined that expressed protein was the 6xHis-GAPDH recombinant protein.

Keywords: Bacillari necrosis of pangasius, *Edwardsiella ictaluri*, GAPDH, cloning and expression, recombinant protein.

¹ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

² Công ty TNHH MTV TMDV và SX Minh Nhật Việt

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh gan thận mủ do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây ra trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*), một đối tượng nuôi chính của ngành công nghiệp nuôi trồng thủy sản Việt Nam, gây ra thiệt hại kinh tế nghiêm trọng cho người nuôi cá tra đặc biệt ở vùng đồng bằng sông Cửu Long. Hiện nay, cá tra bị bệnh gan thận mủ thường được điều trị bằng kháng sinh, tuy nhiên việc sử dụng kháng sinh trong thời gian dài làm tăng nguy cơ vi khuẩn kháng thuốc kháng sinh (Tư Thanh Dung và cs., 2012; Nguyễn Thị Thúy Hằng, 2019), và gây tồn dư kháng sinh trong sản phẩm làm cho việc xuất khẩu thủy sản gặp nhiều khó khăn (Huỳnh Xuân YẾN và cs., 2019). Để góp phần giải quyết vấn đề này, chiến lược sử dụng vaccin để phòng bệnh và chế phẩm sinh học thân thiện với môi trường thay thế kháng sinh để điều trị bệnh gan thận mủ do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây ra trên cá tra đang được các nhà khoa học và người nuôi lựa chọn.

Trên thế giới, đã có một số nghiên cứu về vaccin phòng bệnh gan thận mủ, hầu hết các loại vaccin này đều sử dụng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* đã bất hoạt hoặc vi khuẩn sống được giảm độc lực (Pridgeon và Klesius, 2011). Tồn tại của các loại vaccin này là tiềm ẩn nguy cơ mất an toàn vì vi khuẩn có thể phát triển ngược thành dạng có độc lực (Huỳnh Xuân YẾN và cs., 2019). Để an toàn hơn, gần đây xu hướng nghiên cứu phát triển vaccin tái tổ hợp dựa trên các protein kháng nguyên của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* bước đầu được quan tâm nghiên cứu (Cao và cs., 2014; Huỳnh Xuân YẾN và cs., 2019; Nguyễn Thị Linh Giang và cs., 2019). Trong số các protein kháng nguyên của *Edwardsiella ictaluri*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) là một kháng nguyên màng ngoài, đã được chứng minh có tính sinh miễn dịch cao (Panangala và cs., 2009; Park và cs., 2011), là ứng viên tiềm năng cho việc sử dụng sản xuất vaccin tái tổ hợp đa mục đích để bảo vệ cá tra khỏi vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* (Panangala và cs., 2009; Park và cs., 2011) và các vi khuẩn gram âm

gây bệnh trong họ vi khuẩn đường ruột (Cao và cs., 2014). Mục đích của nghiên cứu này là tạo dòng và biểu hiện protein kháng nguyên tái tổ hợp GAPDH của *Edwardsiella ictaluri* trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3) nhằm tạo nguồn nguyên liệu cho phát triển vaccin và chế phẩm sinh học chứa kháng thể phòng và điều trị bệnh gan thận mủ ở cá tra do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây ra.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu cá tra nghi nhiễm *Edwardsiella ictaluri* thu thập từ các ao nuôi trên địa bàn tỉnh An Giang.

Các vật liệu chính dùng trong nghiên cứu gồm môi trường LB (1% tryptone, 0,5% dịch chiết nấm men, 1% NaCl), chủng vi khuẩn *E. coli* (TOP10, BL21), vector pGEM®-T Easy (Promega), vector pET200/D-TOPO (Invitrogen, Hoa Kỳ), kit tách chiết DNA tổng số (DNeasy Blood & Tissue kits (50), Qiagen), kit tách chiết plasmid tái tổ hợp DNA Plasmid Extraction (ABT, Viet Nam), kit tinh sạch DNA từ gel PCR/Gel purification (ABT, Viet Nam), hóa chất tách chiết protein từ vi khuẩn (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, bộ kit tinh sạch protein ProBond™ Purification System (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập gen mã hóa kháng nguyên GAPDH của *Edwardsiella ictaluri*

Từ các mẫu mô cá tra nghi nhiễm *Edwardsiella ictaluri*, DNA tổng số được tách chiết bằng kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA tổng số được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR để xác định vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* với cặp mồi đặc hiệu: mồi xuôi (EI16sF) 5'-CGGACGGGTGAGTAATGTCT-3' và mồi ngược (EI16sR) 5'-TTAGCCGGTGC TTCTTCTGT-3' (Jesus Genaro Sanchez-Martinez và cs., 2012). Phân lập gen mã hóa kháng nguyên GAPDH bằng cặp mồi được thiết kế bởi Thanh Trung Cao và cs. (2014)

dựa trên trình tự chuỗi nucleotide của gen được công bố trên GenBank (mã số CP028813.1). Trình tự nucleotide mỗi xuôi (GAPDH.F): 5'-CACCATGACTATCAAAGTAGGTATC-3' và mỗi ngược (GAPDH.R): 5'-TTATTTG GAGATGTGCGC-3'.

Phản ứng PCR với thành phần gồm: 25 μ L 2X Go taq green master mix, 2 μ L mỗi xuôi (10 pmol/ μ L), 2 μ L mỗi ngược (10 pmol/ μ L), 2 μ L DNA tổng số và 19 μ L nước cất vô trùng (tổng thể tích 50 μ L), được thực hiện với chu trình luân nhiệt: giai đoạn biến tính 95°C/5 phút; tiếp đến là 30 chu kỳ: 95°C/60 giây, 53°C/60 giây và 72°C/60 giây; cuối cùng là 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% trong đệm 1X TAE với thuốc nhuộm Ethydium bromide (0,5 μ g/L) và phân tích hình ảnh bằng hệ thống Gel Doc XR⁺ (BioRad).

2.2.2. Tạo dòng gen mã hóa kháng nguyên GAPDH của *Edwardsiella ictaluri*

Sản phẩm PCR (gen mã hóa kháng nguyên GAPDH) sau khi tinh sạch bằng kit PCR/Gel purification (ABT) được gắn vào vector pGEM[®]-T Easy (Promega, Hoa Kỳ) theo phương pháp dòng hóa TA. Thành phần phản ứng gắn gồm: 1 μ L 50 ng vector pGEM[®]-T Easy, 5 μ L 2X Rapid Ligation Buffer, 1 μ L (3 đơn vị) T4 DNA ligase, 1 μ L (15 ng) sản phẩm PCR tinh sạch và 2 μ L nước cất vô trùng (tổng thể tích 10 μ L) được ủ ở 25°C trong 3 giờ. Sản phẩm gắn sau đó được biến nạp vào 100 μ L tế bào *E. coli* TOP10 khả biến bằng phương pháp sốc nhiệt ở 42°C trong 45 giây, sau đó ủ trong đá lạnh 3 phút. Thêm 900 μ L môi trường LB vào ống chứa sản phẩm biến nạp và nuôi 1 giờ ở 37°C, lắc 180 vòng/phút, sau đó cấy trái 100 μ L dịch nuôi cấy trên đĩa thạch LB có bổ sung 100 μ g/mL ampicillin, IPTG (0,1M) và X-Gal (20 mg/mL), nuôi ở 37°C trong 16 giờ. Sự hiện diện của gen mã hóa kháng nguyên đích trong các tế bào *E. coli* TOP10 (khuẩn lạc màu trắng) được kiểm tra bằng PCR với cặp mỗi đặc hiệu cho gen kháng nguyên GAPDH đã được đề cập trên và cặp mỗi M13 (M13F: 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' và M13R:

5'CAGGAAACAGCTATGAC-3') được thiết kế sẵn trên vector pGEM[®]-T Easy.

Khuẩn lạc dương tính được nuôi cấy trong 5 mL môi trường LB chứa 100 μ g/mL ampicillin để sản xuất sinh khối. Vector tái tổ hợp được tách bằng kit DNA plasmid extraction (ABT, Việt Nam) và gửi đi giải trình tự nucleotide tại Công ty 1stBASE (Malaysia). Kết quả giải trình tự được phân tích bằng phần mềm BioEdit và so sánh mức độ tương đồng với trình tự đã được công bố trên GenBank (mã số CP028813.1).

2.2.3. Biểu hiện protein kháng nguyên GAPDH trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3)

Để biểu hiện protein kháng nguyên GAPDH trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3), vector tái tổ hợp pGEM[®]-T Easy/GAPDH được sử dụng làm khuôn mẫu cho PCR thu nhận gen mã hóa cho kháng nguyên GAPDH để gắn vào vector biểu hiện pET200/D-TOPO với cặp mỗi đặc hiệu đã được sử dụng (có 4 nucleotide CACC ở đầu 5' của mỗi xuôi để bắt cặp với chuỗi nucleotide GTGG lồi ra ở vector biểu hiện). Tiến hành PCR với thành phần bao gồm 1 μ L vector tái tổ hợp pGEM[®]-T Easy/GAPDH (50 ng), 1 μ L mỗi xuôi GAPDH.F (10 pmol), 1 μ L mỗi ngược GAPDH.R (10 pmol), 10 μ L 5X Hi-Fi Reaction Buffer, 5 μ L dNTP mix (10mM), 1 μ L enzyme VELOCITY DNA polymerase (10 pmol/ μ L) (Bioline, Anh quốc), 31 μ L nước cất vô trùng (tổng thể tích 50 μ L), chu trình nhiệt như PCR phân lập gen GAPDH đã mô tả. Sản phẩm PCR sau khi cắt ra từ gel agarose 1%, được tinh sạch bằng kit PCR/Gel purification (ABT) và gắn vào vector biểu hiện pET200/D-TOPO. Thành phần phản ứng gắn: 1 μ L sản phẩm PCR (10 ng/ μ L), 1 μ L đệm gắn, thêm nước cất vô trùng đủ 5 μ L, 1 μ L vector pET200/D-TOPO (20 ng/ μ L) (tổng thể tích là 6 μ L) trộn nhẹ, đều và ủ ở 25°C trong 60 phút. Vector pET200/D-TOPO tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* BL21 (DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt ở 42°C trong 45 giây với thành phần 3 μ L sản phẩm gắn, 50 μ L tế bào *E. coli* BL21 (DE3) khả biến và 250 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; và 20 mM glucose; pH 7). Sản phẩm biến nạp được cấy trên đĩa thạch LB có chứa kanamycin (100 µg/mL) và ủ ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Các tế bào *E. coli* BL21 (DE3) mọc được trên môi trường chọn lọc (LB + kanamycin) sẽ mang vector tái tổ hợp và được kiểm tra để khẳng định bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu.

Các tế bào *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp (chứa vector mang gen mã hóa kháng nguyên GAPDH) được nuôi trong 50 mL môi trường YJ có bổ sung kanamycin (100 µg/mL), ở 37°C, lắc tốc độ 180 vòng/phút. Khi mật độ quang môi trường đo ở bước sóng 600 nm đạt tới OD₆₀₀ = 0,8 thì bổ sung 40 µL chất cảm ứng IPTG 1M để đạt nồng độ IPTG cuối cùng 0,8 mM và tiếp tục nuôi ở 25°C, lắc 150 vòng/phút, trong 10 giờ. Ly tâm ở tốc độ 6.000 vòng/phút, trong 10 phút để thu sinh khối 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 protein trong thể vùi. Các protein dung hợp 6xHis-GAPDH được tinh sạch bằng kit ProBond™ Purification System (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sự biểu hiện protein kháng nguyên GAPDH trong *E. coli* BL21 (DE3) được đánh giá bằng phương pháp điện di SDS-PAGE 15%.

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

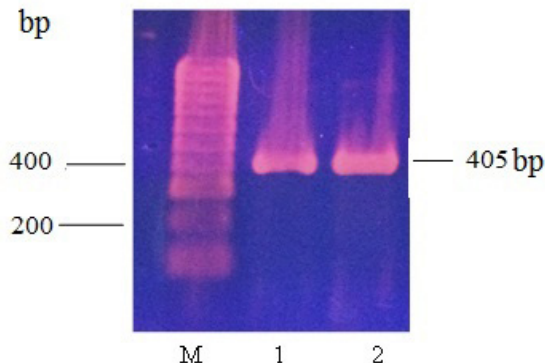
Để xác định sự có mặt của protein tái tổ hợp 6xHis-GAPDH, phương pháp ELISA trực tiếp với kháng thể Anti-His G-HRP (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ) đã được sử dụng. Tóm tắt: phủ 100 µL (nồng độ 10 µg/mL) protein tái tổ hợp 6xHis-GAPDH tinh sạch trong đệm Carbonate-bicarbonate buffer (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) lên giếng ELISA, để qua đêm ở 4°C.

Rửa giếng ELISA với đệm PBS-T (đệm PBS có bổ sung 0,05% Tween 20), sau đó cho vào mỗi giếng 200 µL BSA 1%, ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Bổ sung 100 µL kháng thể HRP Anti-6x His tag® antibody (ab1187, Abcam) đã được pha loãng theo tỷ lệ 1:10.000 trong BSA vào các giếng, ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Rửa với đệm PBS-T. Sau đó bổ sung vào mỗi giếng 100 µL cơ chất TMB (Tetramethylbenzidine), ủ trong 10 phút, dừng phản ứng bằng 50µL HCl 3M và đọc kết quả.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*

Sau khi sử dụng DNA tổng số tách chiết từ các mẫu cá tra nghi nhiễm *Edwardsiella ictaluri* làm khuôn mẫu thực hiện PCR với cặp mồi chỉ thị EI16sF và EI16sR để phát hiện gen *16s rRNA* của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*, sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% để xác định vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* (hình 1).



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi chỉ thị EI16sF và EI16sR cho *Edwardsiella ictaluri*

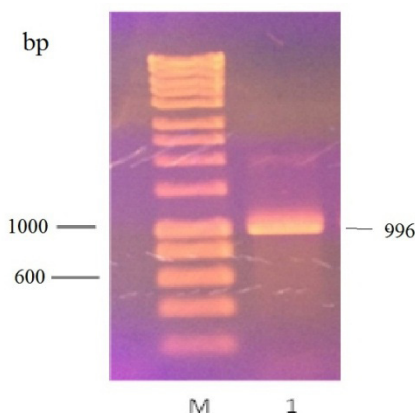
M: Marker hyper ladder 100 (Bioline); 1, 2: Sản phẩm PCR với cặp mồi chỉ thị EI16sF và EI16sR cho *Edwardsiella ictaluri*

Kết quả cho thấy băng DNA được khuếch đại có kích thước khoảng 405 bp (làn 1 và 2), các băng đậm, rõ nét. Kích thước của các băng này phù hợp với kích thước 405 bp theo báo cáo của Jesus Genaro Sanchez-Martinez (2012) khi

sử dụng cặp mồi chỉ thị EI16sF và EI16sR để xác định vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*. Kết quả này khẳng định các mẫu cá tra chúng tôi thu thập được tại tỉnh An Giang bị nhiễm vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*.

3.2. Phân lập gen mã hóa kháng nguyên GAPDH của *Edwardsiella ictaluri*

DNA tổng số từ các mẫu bệnh phẩm (dương tính với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*) được sử dụng làm khuôn để thực hiện PCR phân lập gen mã hóa kháng nguyên GAPDH với cặp mồi đặc hiệu GAPDH.F và GAPDH.R đã được thiết kế (Cao và cs., 2014). Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1%.



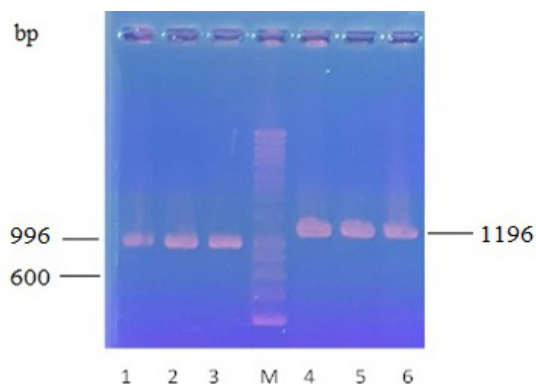
Hình 2. Kết quả phân lập gen GAPDH của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*

M: Marker HyperLadder™ 1kb (Bioline); 1: Sản phẩm PCR gen GAPDH phân lập từ DNA tổng số của mẫu bệnh phẩm với cặp mồi đặc hiệu (Thanh Trung Cao và cs., 2014)

Hình 2 cho thấy có một băng duy nhất, nồng độ cao, rõ nét, với kích thước vào khoảng 996 bp (làn 1). Kích thước này phù hợp kích thước tính toán lý thuyết của gen GAPDH của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*, chứng tỏ nghiên cứu đã phân lập được gen mục tiêu GAPDH từ vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*, và kết quả này được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Kết quả tạo dòng gen mã hóa kháng nguyên GAPDH của *Edwardsiella ictaluri*

Sản phẩm PCR (gen mã hóa kháng nguyên GAPDH của *Edwardsiella ictaluri*) từ gel agarose 1% sau khi tinh sạch được gắn vào vector pGEM® T- Easy, tiếp theo là biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10 bằng phương pháp sốc nhiệt và cấy trải trên đĩa thạch LB có chứa ampicillin, ủ ở 37°C trong 16 giờ. Chọn lọc một số các khuẩn lạc trắng từ môi trường nuôi cấy, thực hiện PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gen mã hóa kháng nguyên GAPDH đã được sử dụng trong phân lập gen và cặp mồi M13 của vector pGEM®-T Easy để xác định sự hiện diện của gene mã hóa kháng nguyên GAPDH của *Edwardsiella ictaluri* trong tế bào vi khuẩn *E. coli* TOP10. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định sự có mặt của gen mã hóa kháng nguyên GAPDH và vector tái tổ hợp pGEM®-T Easy/GAPDH trong tế bào *E. coli* TOP10 được trình bày trên hình 3.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định sự có mặt của gen mã hóa kháng nguyên GAPDH và vector tái tổ hợp pGEM®-T Easy/GAPDH trong tế bào *E. coli* TOP 10

M: Marker HyperLadder™ 1kb (Bioline); 1, 2, 3: Sản phẩm PCR gen GAPDH với cặp mồi đặc hiệu; 4, 5, 6: Sản phẩm PCR gen GAPDH với cặp mồi M13

Kết quả điện di cho thấy sản phẩm PCR của gen GAPDH có độ dài khoảng 996 bp với cặp mồi đặc hiệu và khoảng 1.196 bp với

cặp mồi M13. Các dòng khuẩn lạc cho kết quả PCR dương tính được nuôi trong môi trường LB, thu sinh khối tách plasmid tái tổ hợp và gửi đi giải trình tự. Kết quả giải trình tự và so sánh mức độ tương đồng của trình tự nucleotide cho thấy gen mã hóa cho kháng

nguyên GAPDH phân lập được có độ dài 996 bp, trình tự nucleotide giữa gen mã hoá kháng nguyên GAPDH phân lập được với gen mã hoá kháng nguyên GAPDH đã được công bố trên GenBank (mã số CP028813.1) có độ tương đồng cao (99%, hình 4).

GAPDH	1	ATGACTATCAAAGTAGGTATCAACGGTTTTGGTCGTATCGGCCGTATTGTTTTCCGTGCT	60
CP028813.1	75618	ATGACTATCAAAGTAGGTATCAACGGTTTTGGTCGTATCGGCCGTATTGTTTTCCGTGCT	75677
GAPDH	61	GTTTCAGGAACGTTTCTGACATCGAAATCGTTGGCATCAACGATCTGCTGGATGCCAACTAC	120
CP028813.1	75678	GTTTCAGGAACGTTTCTGACATCGAAATCGTTGGCATCAACGATCTGCTGGATGCCAACTAC	75737
GAPDH	121	ATGGCATAACATGCTGAAGTAGACTCTACTCACGGTCGTTTCAACGGCACTGTTGAAGTG	180
CP028813.1	75738	ATGGCATAACATGCTGAAGTAGACTCTACTCACGGTCGTTTCAACGGCACTGTTGAAGTG	75797
GAPDH	181	GAAGAGGGCCACCTGATCGTTAACGGTAAAAAATCCGTGTACCGCTGAAAGAGATCCG	240
CP028813.1	75798	GAAGAGGGCCACCTGATCGTTAACGGTAAAAAATCCGTGTACCGCTGAAAGAGATCCG	75857
GAPDH	241	GCTAACCTGAAGTGAATGAAATCGGTGTTGACGTTGTTGCCGAGGCGACCGGTCTGTTT	300
CP028813.1	75858	GCTAACCTGAAGTGAATGAAATCGGTGTTGACGTTGTTGCCGAGGCGACCGGTCTGTTT	75917
GAPDH	301	CTGACCGACGAAACCGCACGTAAGCACATCGCCGCGCGCCAGAAAGTCTGTCATGACT	360
CP028813.1	75918	CTGACCGACGAAACCGCACGTAAGCACATCGCCGCGCGCCAGAAAGTCTGTCATGACT	75977
GAPDH	361	GGCCCGTCCAAAGATGCTACCCCGATGTTCTGTTATGGGCGTAAACCACAAGAACTACGCT	420
CP028813.1	75978	GGCCCGTCCAAAGATGCTACCCCGATGTTCTGTTATGGGCGTAAACCACAAGAACTACGCT	76037
GAPDH	421	GGCCAGGCGATCGTTTCCAACGCATCCTGCACCACCAACTGCCTGGCTCCGCTGGCTAAA	480
CP028813.1	76038	GGCCAGGCGATCGTTTCCAACGCATCCTGCACCACCAACTGCCTGGCTCCGCTGGCTAAA	76097
GAPDH	481	GTCCTGAACGACAACCTTCGGCATCGTTGAAGCACTGATGACCACCGTTCACGCAACCACT	540
CP028813.1	76098	GTCCTGAACGACAACCTTCGGCATCGTTGAAGCACTGATGACCACCGTTCACGCAACCACT	76157
GAPDH	541	GCTACCCAGAAAACCGTTGATGGTCCGTCCATGAAGGATTGGCGTGGCGGCCGCGGTGCC	600
CP028813.1	76158	GCTACCCAGAAAACCGTTGATGGTCCGTCCATGAAGGATTGGCGTGGCGGCCGCGGTGCC	76217
GAPDH	601	AGCCAGAACATCATCCCGTCTCCACGGCGCAGCCAAAGCCGTTGGCAAAGTAATCCCG	660
CP028813.1	76218	AGCCAGAACATCATCCCGTCTCCACGGCGCAGCCAAAGCCGTTGGCAAAGTAATCCCG	76277
GAPDH	661	GAGCTGAACGGCAAACTGACCGGCATGGCTTTCCGCGTTCGACCCCGAACGTATCCGTT	720
CP028813.1	76278	GAGCTGAACGGCAAACTGACCGGCATGGCTTTCCGCGTTCGACCCCGAACGTATCCGTT	76337
GAPDH	721	GTTGATCTGACTGCACGCCTGGCCAAGCCAGCTACCTATCAGCAGATCTGTGAAGTGATG	780
CP028813.1	76338	GTTGATCTGACTGCACGCCTGGCCAAGCCAGCTACCTATCAGCAGATCTGTGAAGTGATG	76397
GAPDH	781	AAGGCCGCTTCTGAAGGCGAAATGAAAGGCGTCTGGGCTACACCGATGAAGCCGTCGTT	840
CP028813.1	76398	AAGGCCGCTTCTGAAGGCGAAATGAAAGGCGTCTGGGCTACACCGATGAAGCCGTCGTT	76457
GAPDH	841	TCTACCGATTTCATGGCGAAGTATGCACCTCAGTGTGTTGATGCCGACGCCGGTATCTCT	900
CP028813.1	76458	TCTACCGATTTCATGGCGAAGTATGCACCTCAGTGTGTTGATGCCGACGCCGGTATCTCT	76517
GAPDH	901	CTGAATGACAACCTTCGTGAAACTGGTTTCTGGTATGACAACGAAACTGGCTACTCGAAT	960
CP028813.1	76518	CTGAATGACAACCTTCGTGAAACTGGTTTCTGGTATGACAACGAAACTGGCTACTCGAAT	76577
GAPDH	961	AAAGTTCTGGATCTGATCGCGCACATCTCCAAATAA	996
CP028813.1	76578	AAAGTTCTGGATCTGATCGCGCACATCTCCAAATAA	76613

Hình 4. Trình tự và mức độ tương đồng của trình tự nucleotide giữa gen mã hoá kháng nguyên GAPDH phân lập được với gen mã hoá kháng nguyên GAPDH đã được công bố trên GenBank (mã số CP028813.1)

Kết quả phân tích suy diễn chuỗi nucleotide của gen GAPDH phân lập được từ mẫu bệnh phẩm của cá tra tại tỉnh An Giang cho thấy nó mã hóa cho một đoạn polypeptide gồm 331

amino acid, liên tục, và tương đồng 99% so với trình tự chuỗi amino acid của kháng nguyên GAPDH được công bố trên GenBank (Mã số: AVZ80933.1) (hình 5).

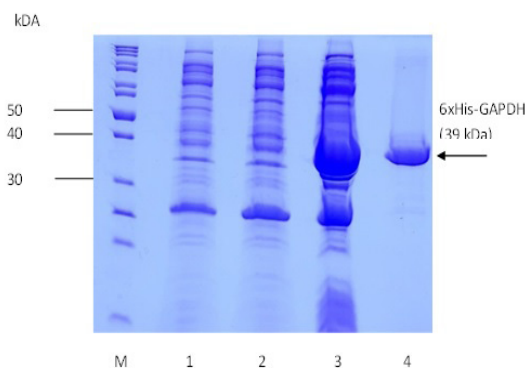
GAPDH	1	MTIKVGINGFGRIGRIVFRA	QERSDIEIVGINDLLDANYMAYMLKYDSTHGRFNGTVEV	60
AVZ80933.1	1	MTIKVGINGFGRIGRIVFRA	QERSDIEIVGINDLLDANYMAYMLKYDSTHGRFNGTVEV	60
GAPDH	61	EEGHLIVNGKKIRVTAERDPANLKWNEIGVDVVAEATGLFLTDETARKHIAAGAKKVMT		120
AVZ80933.1	61	EEGHLIVNGKKIRVTAERDPANLKWNEIGVDVVAEATGLFLTDETARKHIAAGAKKVMT		120
GAPDH	121	GPSKDATPMFVMGVNHKNYAGQAIVSNASCTTNCLAPLAKVLNDNFGIVEALMTTVHATT		180
AVZ80933.1	121	GPSKDATPMFVMGVNHKNYAGQAIVSNASCTTNCLAPLAKVLNDNFGIVEALMTTVHATT		180
GAPDH	181	ATQKTVDGSPMKDWRGGRGASQNIIPSSTGAAKAVGKVIPELNGKLTGMAFRVPTPNVSV		240
AVZ80933.1	181	ATQKTVDGSPMKDWRGGRGASQNIIPSSTGAAKAVGKVIPELNGKLTGMAFRVPTPNVSV		240
GAPDH	241	VDLTARLAKPATYQQICEVMKAAASEGEMKGVLYGTDEAVVSTDFNGEVCTSVFDADAGIS		300
AVZ80933.1	241	VDLTARLAKPATYQQICEVMKAAASEGEMKGVLYGTDEAVVSTDFNGEVCTSVFDADAGIS		300
GAPDH	301	LNDNFVKLVSWYDNETGYSNKVLDLIAHISK		331
AVZ80933.1	301	LNDNFVKLVSWYDNETGYSNKVLDLIAHISK		331

Hình 5. Mức độ tương đồng của trình tự amino acid giữa protein kháng nguyên GAPDH của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* phân lập được và trình tự amino acid của kháng nguyên GAPDH được công bố trên GenBank (mã số AVZ80933.1)

Các kết quả phân tích trên khẳng định rằng gen GAPDH của *Edwardsiella ictaluri* đã được tạo dòng thành công vào vector pGEM®-T Easy, và vector tái tổ hợp pGEM®-T Easy/GAPDH đã được biến nạp thành công vào tế bào *E. coli* TOP10 khả biến.

3.4. Kết quả biểu hiện protein kháng nguyên GAPDH của *Edwardsiella ictaluri* trong *E. coli* BL21 (DE3)

Gen mã hóa kháng nguyên GAPDH được tách từ vector tái tổ hợp pGEM®-T Easy/GAPDH bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu GAPDH.F và GAPDH.R, sau đó đưa vào vector biểu hiện pET200/D-TOPO và biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3). Kết quả điện di SDS-PAGE 15% đánh giá biểu hiện protein GAPDH tái tổ hợp ở tế bào *E. coli* BL21 (DE3) trong môi trường YJ được thể hiện ở hình 6.



Hình 6. Kết quả điện di SDS-PAGE 15% biểu hiện protein dung hợp 6xHis-GAPDH trong *E. coli* BL21 (DE3) trên môi trường YJ

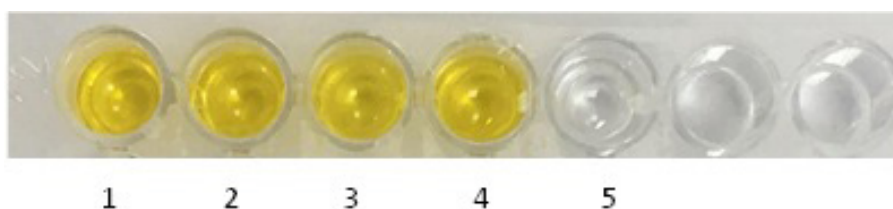
M: Protein marker (10- 200 kDa, Bio Basic; 1: Tế bào *E. coli* mang vector tái tổ hợp, không được cảm ứng bằng IPTG; 2: Protein trong dịch nổi tế bào *E. coli* mang vector tái tổ hợp được cảm ứng bằng IPTG; 3: Protein thể vùi tế bào *E. coli* mang vector tái tổ hợp được cảm ứng bằng IPTG; 4: Protein dung hợp 6xHis-GAPDH sau tinh sạch.

Hình 6 cho thấy có các băng protein rất yếu có kích thước tương đương protein đích trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp không được cảm ứng IPTG (lần 1) và trong dịch nổi tế bào *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp được cảm ứng bằng 0,8 mM IPTG (lần 2). Tuy nhiên, có thể quan sát thấy rõ sự hiện diện một băng protein thể vùi có kích thước tương đương protein đích trong kết tủa tế bào *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp được cảm ứng bằng IPTG (lần 3), và sau tinh sạch (lần 4). Kết quả này cho thấy chất cảm ứng IPTG là cần thiết cho biểu hiện protein GAPDH tái tổ hợp; protein kháng nguyên GAPDH biểu hiện ở dạng thể vùi và dung dịch Urea 8M có hiệu quả trong hòa tan protein thể vùi trong kết tủa. Theo tính toán, biểu hiện protein GAPDH tái tổ hợp sẽ

sản xuất ra một protein dung hợp và có khối lượng phân tử khoảng 39 kDa, gồm trên 35 kDa của protein GAPDH và gần 4 kDa đoạn dung hợp của vector biểu hiện pET200/D-TOPO, kết quả sau khi tinh sạch protein thu được một băng protein duy nhất có khối lượng phân tử bằng kích thước đã được tính toán khoảng 39 kDa. Kết quả này cho thấy protein GAPDH tái tổ hợp đã được biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3).

3.5. Kết quả ELISA trực tiếp xác định protein tái tổ hợp GAPDH của *Edwardsiella ictaluri*

Kết quả xác định sự có mặt của protein dung hợp 6xHis-GAPDH bằng phương pháp ELISA trực tiếp với kháng thể HRP Anti-6x His tag® antibody đã được thực hiện. Kết quả được trình bày trên hình 7.



Hình 7. Kết quả ELISA trực tiếp xác định protein dung hợp 6xHis-GAPDH của *Edwardsiella ictaluri*

1: Đối chứng dương (100 µL dung dịch kháng nguyên tái tổ hợp 6xHis-P102; nồng độ 10 µg/mL); 2, 3, 4: Các giếng được phủ 100 µL dung dịch kháng nguyên tái tổ hợp GAPDH (nồng độ 10 µg/mL); 5: Giếng đối chứng (không phủ kháng nguyên tái tổ hợp GAPDH)

Kết quả cho thấy có sự xuất hiện phản ứng màu vàng đặc hiệu ở giếng đối chứng dương (giếng 1) và các giếng được phủ protein kháng nguyên GAPDH tái tổ hợp (giếng 2, 3 và 4), không có phản ứng màu ở giếng đối chứng không phủ kháng nguyên (giếng 5). Điều này chứng tỏ rằng protein tái tổ hợp được sản xuất trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3) chính là protein kháng nguyên GAPDH có đuôi dung hợp 6xHis. Trong một nghiên cứu trước đây, Cao và cs. (2014) đã thông báo rằng vaccin GAPDH tái tổ hợp từ *Edwardsiella ictaluri* có hiệu quả chống lại *Edwardsiella tarda* ở cá rô phi. Gần đây,

Banu và cs. (2017) đã chỉ ra rằng GAPDH tái tổ hợp được sản xuất ra từ *Edwardsiella tarda* có tính bảo tồn cao và có tiềm năng phát triển thành vaccin chống lại các vi khuẩn gây nhiễm trùng ở cá nước ngọt và nước lợ. Với việc sản xuất thành công GAPDH tái tổ hợp từ *Edwardsiella ictaluri* trong nghiên cứu này và những kết quả nghiên cứu tích cực liên quan được công bố sẽ khích lệ nhóm nghiên cứu tiếp tục phát triển vaccin tái tổ hợp và chế phẩm sinh học chứa kháng thể để phòng và điều trị bệnh gan thận mủ ở cá tra do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây ra nói riêng và các bệnh Edwardsiellois nói chung.

IV. KẾT LUẬN

Gen mã hóa cho kháng nguyên GAPDH của *Edwardsiella ictaluri* đã được tạo dòng và biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3). Gen có chiều dài 996 bp, tương đồng 99% so với trình tự gen mã hóa kháng nguyên GAPDH đã được công bố trên GenBank (mã số CP028813.1), và mã hóa chuỗi polypeptide dài 331 amino acid, có độ tương đồng 99% với trình tự chuỗi công bố trên GenBank (mã số AVZ80933.1). Khối lượng phân tử protein kháng nguyên GAPDH dung hợp khoảng 39 kDa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Từ Thanh Dung, Nguyễn Thị Tiên và Nguyễn Anh Tuấn, 2012. Nghiên cứu tác nhân gây bệnh trắng đuôi trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) và giải pháp phòng trị. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 22c, 136-145.
2. Nguyễn Thị Linh Giang, Nguyễn Anh Minh, Huỳnh Xuân Yển, Trần Cát Đông, Vũ Thanh Thảo, 2019. Xác định epitop tiềm năng trên protein flic và ompn3 của *Edwardsiella ictaluri* in silico để hướng đến ứng dụng làm vaccin phòng bệnh gan thận mù. *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, phụ bản Tập 23, Số 2, 32-39.
3. Nguyễn Thị Thúy Hằng, 2019. Đánh giá hiệu quả kháng khuẩn của bacteriocin đối với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan, thận mù trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, Số 3, 25-31.
4. Huỳnh Xuân Yển, Nguyễn Anh Minh, Trần Cát Đông, Vũ Thanh Thảo, 2019. Tạo dòng kháng nguyên flic của *Edwardsiella ictaluri* khảm trong tiêm mao của *bacillus subtilis*. *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, phụ bản Tập 23, Số 2, 24-31.
5. Banu, H., Anand, D., Bedekar, M.K., Rajendra, K.V., and Makesh, M., 2017. Monoclonal antibodies against recombinant GAPDH of *Edwardsiella tarda* reveal the conserved nature of the protein. *Food and Agricultural Immunology*, 28(4), 685–698.
6. Cao, T.T, Tsai, M.A., Yang, C.D., Wang, P.C., Kuo, T. Y., Chen, H.C. G., and Chen, S. C., 2014. Vaccine efficacy of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from *Edwardsiella ictaluri* against *E. tarda* in tilapia. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 60, 241–250.
7. Jesus Genaro Sanchez-Martinez, Roberto Perez-Castaneda, Ma. De la Luz Vazquez Saucedo, Jaime Rabago Castro and Gabriel Aguirre-Guzman, 2012. Rapid detection of *Edwardsiella ictaluri* from channel catfish tissue and water samples by PCR amplification. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 11 (20), 3823-3826.
8. Panangala, V.S., Russo, R., van Sante, V.L., Wolfe, K.G., and Klesius, P.H., 2009. Organization and sequence of four flagellin-encoding genes of *Edwardsiella ictaluri*. *Aqua. Res.*, 40, 1135-1147.
9. Park, S.B., Jang, H.B., Nho, S.W., Cha, I.S., Hikima, J-i, Ohtani, M., et al., 2011. Outer membrane vesicles as a candidate vaccine against Edwardsiellosis. *PLoS ONE* 6(3): e17629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017629>.
10. Pridgeon, J.W., Klesius, P.H., 2011. Development of a novobiocin-resistant *Edwardsiella ictaluri* as a novel vaccine in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Vaccine*. 29(34), 5631-5637.

Ngày nhận 15-3-2022

Ngày phản biện 24-6-2022

Ngày đăng 1-9-2022