

TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA KHÁNG NGUYÊN P102 CỦA *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* TRONG *E. COLI* BL21 (DE3)

Phùng Thăng Long¹, Lê Việt Quân², Đồng Hữu Rin²,
Lê Quốc Việt², Đặng Thị Hương², Nguyễn Thị Thu Hiền¹, Đinh Thị Bích Lan¹

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tạo dòng và biểu hiện thành công đoạn gen mã hóa kháng nguyên P102 của *Mycoplasma hyopneumoniae* phân lập từ mẫu phổi của lợn thu thập tại tỉnh Thừa Thiên-Huế, Việt Nam. Đoạn gen mã hóa cho kháng nguyên P102 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 P102 có chiều dài 912 bp, mã hóa một chuỗi polypeptide dài 304 amino acid, và tương đồng 100% với trình tự chuỗi polypeptide của kháng nguyên P102 đã được công bố trên GenBank (mã số AAZ44196.1). Kết quả điện di trên SDS-PAGE cho thấy protein tái tổ hợp 6xHis-P102 có khối lượng phân tử khoảng 38 kDa.

Từ khóa: *Mycoplasma hyopneumoniae*, P102, tạo dòng và biểu hiện, kháng nguyên tái tổ hợp.

Cloning and expression of gene encoding P102 antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *E. coli* BL21 (DE3)

Phung Thang Long, Le Viet Quan, Dong Huu Rin,
Le Quoc Viet, Dang Thi Huong, Nguyen Thi Thu Hien, Dinh Thi Bich Lan

SUMMARY

In this study, we successfully cloned and expressed a fragment of gene encoding P102 antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolated from lung samples of pigs raised in Thua Thien-Hue province, Viet Nam. The fragment of gene encoding P102 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 fragment length of gene encoding P102 antigen was 912 bp, encoding a polypeptide chain with 304 amino acid residues, and 100% similarity to the polypeptide chain of P102 antigen in GenBank (accession number AAZ44196.1). Results of SDS-PAGE electrophoresis showed that molecular weight of 6xHis-P102 recombinant protein was about 38 kDa.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*, P102, cloning and expression, recombinant antigen.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mycoplasma hyopneumoniae (*M. hyopneumoniae*) là vi khuẩn gây bệnh viêm phổi địa phương (hay còn gọi là bệnh suyễn) trên lợn [9]. Bệnh được phát hiện ở nhiều quốc gia trên thế giới [9] trong đó có Việt Nam [1, 2]. Mặc dù không gây chết hàng loạt nhưng

M. hyopneumoniae gây thiệt hại nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi lợn vì làm cho gia súc bị ho kéo dài, sốt, còi cọc chậm lớn, làm giảm hiệu quả sử dụng thức ăn và tăng chi phí chăn nuôi [8, 9, 11]. Mặt khác, *M. hyopneumoniae* làm tổn hại hệ thống lông rung của đường hô hấp, làm suy giảm đáp ứng miễn dịch tự nhiên, mở đường cho sự xâm nhập của nhiều tác nhân gây bệnh khác như vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*,

¹ Trường Đại học Nông Lâm - Đại học Huế

² Công ty TNHH MTV TMDV và SX Minh Nhật Việt

virus cúm, virus tai xanh [9, 11, 12].

Hiện nay đã có một số vaccin lưu hành trên thị trường nhưng hiệu quả phòng bệnh chưa cao [2, 10, 11], nên người chăn nuôi thường sử dụng kháng sinh để phòng trị bệnh suyễn lợn dẫn đến hiện tượng vi khuẩn kháng kháng sinh và tồn dư kháng sinh trong thịt lợn, ảnh hưởng nghiêm trọng đến chất lượng thực phẩm. Vì vậy, nghiên cứu chế phẩm (kháng thể hoặc vaccin thể hệ mới) thay thế kháng sinh trong phòng trị bệnh do *M. hyopneumoniae* gây ra ở lợn là rất cần thiết.

P102 là một protein bề mặt, có vai trò quan trọng trong cơ chế sinh bệnh của *M. hyopneumoniae*, đã được nhiều nghiên cứu chứng minh khả năng gây được đáp ứng miễn dịch chống *M. hyopneumoniae* và có thể sử dụng để chế vaccin thể hệ mới [3, 4, 6, 7, 8]. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tạo ra kháng nguyên P102 tái tổ hợp, nhằm tạo nguồn nguyên liệu cho các nghiên cứu phát triển vaccin hoặc kháng thể dùng trong phòng và trị bệnh do *M. hyopneumoniae* gây ra ở lợn.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu chính

Các mẫu phổi tươi của lợn nghi bị nhiễm *M. hyopneumoniae*.

Vector pGEM[®]-T Easy (Promega, Hoa Kỳ), vector pET200/D-TOPO (Invitrogen, Hoa Kỳ), chủng vi khuẩn *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Hoa Kỳ) và *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen, Hoa Kỳ), kit Isolate II PCR and Gel (Bioline, Anh Quốc), kit DNA plasmid Extraction (ABT), kit ProBond[™] Purification System (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập gen mã hóa kháng nguyên

Các mẫu phổi tươi của lợn nghi bị nhiễm *M. hyopneumoniae* được thu thập từ các đàn lợn nuôi trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên-Huế. ADN tổng số được tách chiết và tinh sạch từ mẫu phổi bằng phương pháp phenol - chloroform [5], và được sử dụng làm nguyên liệu cho phản

ứng khuếch đại đoạn gen mã hóa kháng nguyên P102 với cặp mồi đặc hiệu đã được thiết kế trong nghiên cứu của Galli và cs. [4]:

Mồi xuôi P102F: 5'-CACCGAGCTCG-TATCAAAAAGCAGATCGA-3'

Mồi ngược P102R: GCTTTTATTGTTTATA-TATAATTACTAAT-3'.

Thành phần phản ứng PCR bao gồm: 12,5 µl 2X Go taq green master mix, 1 µl mồi xuôi (10 pmol/µl), 1 µl mồi ngược (10 pmol/µl), 1 µl ADN tổng số và 9,5 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, 53°C/30 giây và 72°C/60 giây, cuối cùng là 72°C/5 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di agarose gel 1% với thuốc nhuộm ethidium bromide (0,5 µg/l).

2.2.2. Tạo dòng đoạn gen mã hóa kháng nguyên P102

Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch bằng kit Isolate II PCR and Gel (Bioline) được tạo dòng trong vector pGEM[®]-T Easy (Promega) theo phương pháp dòng hóa TA. Thành phần phản ứng gắn bao gồm: 50 ng vector pGEM[®]-T Easy, 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. Sau đó sản phẩm gắn được biến nạp vào 50 µl tế bào *E. coli* TOP 10 khả biến bằng phương pháp sốc nhiệt ở 42°C trong 45 giây, sau đó ủ trong đá lạnh 3 phút. Thêm 950 µl môi trường LB vào ống chứa sản phẩm biến nạp và nuôi trong 1 giờ ở 37°C, lắc 200 vòng/phút, sau đó cấy trải 100 µl dịch nuôi cấy lên môi trường LB đặc có bổ sung 100 µg/ml ampicillin, 100 mM IPTG and 20 mg/ml X-gal, ủ ở 37°C trong 16 giờ. Kiểm tra sự có mặt của gen mã hóa kháng nguyên trong các tế bào *E. coli* TOP10 bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu của gen P102 (P102F và P102R) và cặp mồi M13 (M13F: 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' và M13R: 5'CAGGAAACAGCTATGAC-3') được thiết kế sẵn trên vector pGEM[®]-T Easy.

Vector tái tổ hợp pGEM[®]-T Easy/P102 được tách bằng DNA plasmid Extraction kit (ABT, Việt Nam) và gửi đi giải trình tự nucleotide tại Công ty 1stBASE (Singapore). 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.

2.2.3. Gắn gen mã hóa kháng nguyên P102 vào vector pET200/D-TOPO và biểu hiện trong *E. coli* BL21 (DE3)

Vector tái tổ hợp pGEM[®]-T Easy/P102 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 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[®]-T Easy/P102 (50 ng), 1 µl mồi xuôi P102F (10 pmol/µl), 1 µl mồi ngược P102R (10 pmol/µl), 5 µl đệm PCR 10X, 1 µl dNTP (10 pmol/µl), 0,5 µl enzyme pfu (5 U/µl), nước cất vô trùng vừa đủ 50 µl với chu trình nhiệt như đã mô tả ở trên. Sau đó, sản phẩm PCR được gắn vào vector pET200/D-TOPO với thành phần phản ứng gắn bao gồm 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.

Các tế bào *E. coli* BL21 (DE3) có chứa vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên P102 (pET200/D-TOPO/P102) 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 đo ở bước sóng 600 nm đạt tới OD=0,8 thì bổ sung 40 µl chất cảm ứng IPTG 1M (Biorad) để đạt nồng độ

0,8 mM và tiếp tục ủ ở 25°C với tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 8 giờ. Sau đó, 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-P102 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 P102 trong *E. coli* BL21(DE3) được đánh giá bằng phương pháp điện di SDS-PAGE.

2.2.4. Kiểm tra tính đặc hiệu của kháng nguyên tái tổ hợp P102 bằng Western blot

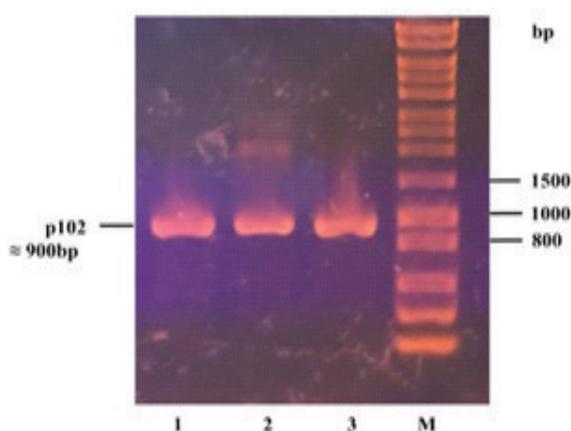
Mẫu protein tái tổ hợp tinh khiết được điện di SDS-PAGE với nồng độ gel 12%. Sau đó protein được chuyển lên màng PVDF (Biorad) trong 2 giờ ở hiệu điện thế 120V. Thu màng và ủ với dung dịch skim milk 5% pha trong TBS (25mM Tris-HCl, 25mM NaCl, pH 7,5) trong 2 giờ. Sau khi rửa ba lần bằng T-TBS (TBS và 0,05% Tween 20) và TBS, màng được ủ với kháng thể kháng HIS TAG trong 2 giờ. Tiếp tục rửa màng ba lần với đệm T-TBS và TBS. Ủ màng với kháng thể gắn enzyme His G-horseradish peroxidase (HRP) (Biorad) được pha loãng trong dung dịch skim milk 1% (tỷ lệ thể tích 1:2500) trong 2 giờ. Rửa màng ba lần với T-TBS và TBS.

Protein đích được phát hiện bằng 0,005% (w/v) 4 chloro-1-naphthol và 0,015% (v/v) hydro peroxidase trong đệm TBS.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập đoạn gen mã hóa kháng nguyên P102 của *M. hyopneumoniae*

Sau khi tách ADN tổng số của các mẫu mô phổi, chúng tôi tiến hành phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu để nhân đoạn gen mã hóa cho kháng nguyên P102. Kết quả điện di sản phẩm (hình 1) cho thấy các băng ADN được khuếch đại có kích thước khoảng 900 bp. Sản phẩm PCR cho một băng, nồng độ cao, sáng và rõ nét.



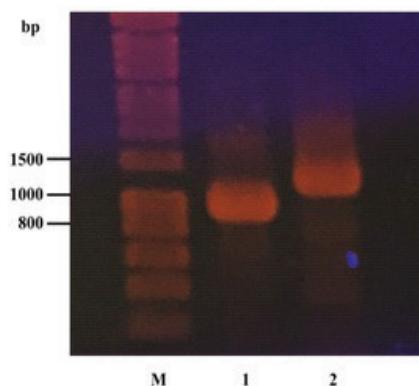
Hình 1. Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu cho đoạn gen mã hóa kháng nguyên P102

M: Marker HyperLadder™ 1kb (Bioline); 1, 2, 3: Sản phẩm PCR với các mẫu ADN khác nhau

3.2. Kết quả tạo dòng gen mã hóa kháng nguyên P102 của *M. hyopneumoniae*

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/P102 vào tế bào *E. coli* TOP10. Kết quả biến nạp thu được hai dòng khuẩn lạc trắng và xanh. Chọn các khuẩn lạc trắng để làm PCR với cặp mồi đặc hiệu của gen *P102* và cặp mồi M13 của vector pGEM®-T Easy để kiểm tra sự hiện diện của đoạn gen mã hóa kháng nguyên

P102. Kết quả được trình bày ở hình 2. Kết quả điện di cho thấy các khuẩn lạc được kiểm tra đều cho kết quả PCR dương tính, băng ADN khuếch đại có kích thước khoảng 900 bp khi thực hiện PCR với cặp mồi P102 và khoảng 1100 bp khi thực hiện PCR với cặp mồi M13. Điều này chứng tỏ gen mã hóa kháng nguyên P102 đã được tạo dòng thành công vào vector pGEM®-T Easy trong tế bào *E. coli* TOP10.



Hình 2. Điện di sản phẩm PCR xác định sự có mặt của plasmid tái tổ hợp pGEM®-T Easy/P102 trong tế bào *E. coli* TOP10

M: Marker HyperLadder™ 1kb (Bioline), 1: Sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gen *P102*, 2: Sản phẩm PCR với cặp mồi M13.

Kết quả giải trình tự cho thấy đoạn gen mã hóa cho kháng nguyên P102 phân lập được có độ dài 912 bp, có độ tương đồng cao (99%) với đoạn gen mã hóa cho kháng nguyên P102 của *M. hyopneumoniae* đã được công bố trên GenBank (mã số AE017243.1) (hình 3).

Sự sai khác của nucleotide thứ 414 không làm ảnh hưởng đến quá trình biểu hiện protein vì trình tự amino acid của kháng nguyên P102 thu được có độ tương đồng 100% với trình tự amino acid của kháng nguyên P102 đã được công bố trên GenBank (mã số AAZ44196.1) (hình 4).

p102	1	GTATCAAAGCAGATCGAGCAATTATTTATCAAGGATCTAAAATTAGTCTTGGTGGTCTA	60
AE017243.1	138283	GTATCAAAGCAGATCGAGCAATTATTTATCAAGGATCTAAAATTAGTCTTGGTGGTCTA	138224
p102	61	ATTAATTCTGATAAGTCTGCCTATGATGAGATTAACAATTTAGCCAGATCTTTTCCTT	120
AE017243.1	138223	ATTAATTCTGATAAGTCTGCCTATGATGAGATTAACAATTTAGCCAGATCTTTTCCTT	138164
p102	121	GATGCAACAATAGGAGAACCACTGATTATAAAAAGCAAGCaaaaaaGATTATACCTTA	180
AE017243.1	138163	GATGCAACAATAGGAGAACCACTGATTATAAAAAGCAAGCAAAAAAAAAGATTATACCTTA	138104
p102	181	AAATCGTTAAGAGATTTAATGGGTAATGGCTTTGTTTATAAACAGAAACTGGATCAAT	240
AE017243.1	138103	AAATCGTTAAGAGATTTAATGGGTAATGGCTTTGTTTATAAACAGAAACTGGATCAAT	138044
p102	241	CCACAAGAAAATGTAAGTCAAACTAGAAATACAAACACAAGCAGAGCaaaaaaCCTCTA	300
AE017243.1	138043	CCACAAGAAAATGTAAGTCAAACTAGAAATACAAACACAAGCAGAGCAAAAAAAAAAGCTCTA	137984
p102	301	CCAGGACTTAGATCAGGATTAATTTATATTGCATTTACCGTTAATAATATCAATAAAAAAT	360
AE017243.1	137983	CCAGGACTTAGATCAGGATTAATTTATATTGCATTTACCGTTAATAATATCAATAAAAAAT	137924
p102	361	GATTATAAACCTCATTATCTAATAAGAGATAAAAATGATAAAGGTGCTTCATTCAGAGA	420
AE017243.1	137923	GATTATAAACCTCATTATCTAATAAGAGATAAAAATGATAAAGGTGCTTCATTCAGAGA	137864
p102	421	TATCAAGATAAGGAAGAACCAAAACGCTTTTGAGATTAGAATTGATTATATGAGCCGTGAT	480
AE017243.1	137863	TATCAAGATAAGGAAGAACCAAAACGCTTTTGAGATTAGAATTGATTATATGAGCCGTGAT	137804
p102	481	GACTTCAGGGATAAAACAATTTTCCGGCTGCTGATACGATATTAGATGCAAGTGGTCAATT	540
AE017243.1	137803	GACTTCAGGGATAAAACAATTTTCCGGCTGCTGATACGATATTAGATGCAAGTGGTCAATT	137744
p102	541	GATCCTCGATCAAAAGaaaaaaTTATTCTCCGTCAAAACGCTGATTATTTATTAGTAGTT	600
AE017243.1	137743	GATCCTCGATCAAAAGAAAAAAATTTATTCTCCGTCAAAACGCTGATTATTTATTAGTAGTT	137684
p102	601	TATAAGTCaaaaaaGATATTGTAACAGAGCTTTATTCACTACCTTCAGCACAAAGATAAT	660
AE017243.1	137683	TATAAGTCAAAAAAGATATTGTAACAGAGCTTTATTCACTACCTTCAGCACAAAGATAAT	137624
p102	661	AACaagaaaaagattgttaaaaaataaaaaatagaaaaTCATTTCCCTCTCAAGGTTATACA	720
AE017243.1	137623	AACaagaaaaagattgttaaaaaataaaaaatagaaaaTCATTTCCCTCTCAAGGTTATACA	137564
p102	721	GTTCAAGGTTCAATTATTATATTCTTTATTAGTCTTAATAAAAATGGAGATAGTCAACCT	780
AE017243.1	137563	GTTCAAGGTTCAATTATTATATTCTTTATTAGTCTTAATAAAAATGGAGATAGTCAACCT	137504
p102	781	CAAAACCCAAAAACCCAAACCGCAGCTGTAAGTATAAAAAGCAATAGCATTATTTGATAAA	840
AE017243.1	137503	CAAAACCCAAAAACCCAAACCGCAGCTGTAAGTATAAAAAGCAATAGCATTATTTGATAAA	137444
p102	841	AAATCATTACAAAACGATACAGAAAAAATGCGTTTAAATAAATAATGCTTTTATTAGTAAT	900
AE017243.1	137443	AAATCATTACAAAACGATACAGAAAAAATGCGTTTAAATAAATAATGCTTTTATTAGTAAT	137384
p102	901	TATATAAAACAA 912	
AE017243.1	137383	TATATAAAACAA 137372	

Hình 3. Mức độ tương đồng của trình tự nucleotide giữa đoạn gen mã hoá kháng nguyên P102 phân lập được với đoạn gen mã hoá kháng nguyên P102 đã được công bố trên GenBank (mã số AE017243.1)

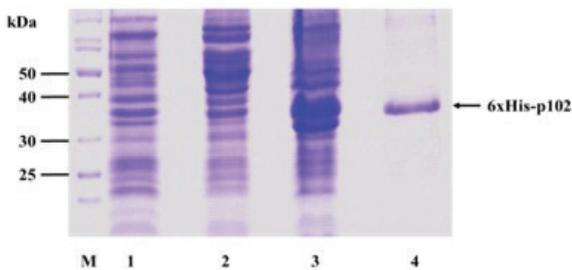
p102	1	VSKADRAIIYQGSKISLGGGLNSDKSAYDEIKQFSPDLFLDATIGEOPDYKQAKKDYTL	
AAZ44196.1	646	VSKADRAIIYQGSKISLGGGLNSDKSAYDEIKQFSPDLFLDATIGEOPDYKQAKKDYTL	
p102	61	KSLRDLMGNGFVYKPEPETSNPQENVLKLELQTQAEQKKPLPGLRSLGIYIAFTVNNINKN	
AAZ44196.1	706	KSLRDLMGNGFVYKPEPETSNPQENVLKLELQTQAEQKKPLPGLRSLGIYIAFTVNNINKN	
p102	121	DYKPHYLIRDKNKGVFIQRYQDKEEPNAFIRIDSYPDDFRDKQFQAADTILDASGSI	
AAZ44196.1	766	DYKPHYLIRDKNKGVFIQRYQDKEEPNAFIRIDSYPDDFRDKQFQAADTILDASGSI	
p102	181	DPRSKKKIILRNADYLLVYKSKKDIVTELYSLPSAQDNNKEIKVKNRKSFFSQGYT	
AAZ44196.1	826	DPRSKKKIILRNADYLLVYKSKKDIVTELYSLPSAQDNNKEIKVKNRKSFFSQGYT	
p102	241	VQGSLLYSLFSPNKIGDSQPQNPKTQPPAVSIKAIALFDKKSFTNDTEKMLINNAFISN	
AAZ44196.1	886	VQGSLLYSLFSPNKIGDSQPQNPKTQPPAVSIKAIALFDKKSFTNDTEKMLINNAFISN	
p102	301	YIKQ 304	
AAZ44196.1	946	YIKQ 949	

Hình 4. Mức độ tương đồng của trình tự amino acid giữa kháng nguyên P102 phân lập được và kháng nguyên P102 đã được công bố trên GenBank (mã số AAZ44196.1)

3.3. Kết quả biểu hiện đoạn gen mã hóa kháng nguyên P102

Gen mã hóa kháng nguyên P102 được tách từ vector pGEM[®]-T Easy/P102 bằng phản ứng PCR với cặp mồi P102F và P102R, 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.

Sự biểu hiện protein P102 tái tổ hợp ở *E. coli* BL21 (DE3) trong môi trường YJ được thể hiện trên gel polyacrylamide 15% có chứa SDS (hình 5).



Hình 5. Điện di SDS-PAGE đánh giá khả năng biểu hiện protein tái tổ hợp P102 trong *E. coli* BL21 (DE3)

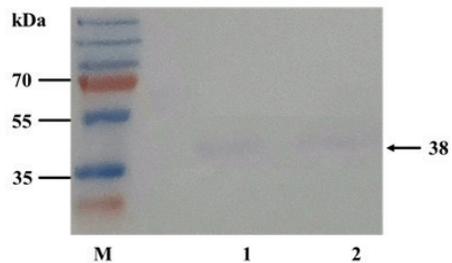
M: Marker 10-200 kDa (Bio basic), 1: Dịch protein thu được từ tế bào *E. coli* mang vector tái tổ hợp, không cảm ứng bằng IPTG, 2: Dịch protein thu được từ tế bào *E. coli* mang vector tái tổ hợp được cảm ứng bằng IPTG, 3: Protein thể vùi thu được từ tế bào *E. coli* mang vector tái tổ hợp được cảm ứng bằng IPTG, 4: Protein dung hợp 6xHis-P102 tái tổ hợp sau tinh sạch.

Theo tính toán, protein P102 tái tổ hợp được biểu hiện sẽ có khối lượng khoảng 38,3 kDa gồm protein P102 có khối lượng phân tử khoảng 34,6 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 P102 tái tổ hợp không có mặt trong protein dịch thể, mà nằm trong protein thể vùi có khối lượng khoảng 38 kDa, phù hợp với kích thước đã được ước tính. Như vậy, protein P102 tái tổ hợp đã được biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3), và dung dịch Urea 8M có hiệu quả trong hòa tan protein trong

thể vùi. Sau khi tinh sạch protein thể vùi bằng kit ProBond[™] Purification System (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ), thu được một băng protein duy nhất có khối lượng khoảng 38 kDa. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên P102 của *M. hyopneumoniae* trong *E. coli* BL21 (DE3) của Galli và cs. (2013).

3.4. Kiểm tra tính đặc hiệu của kháng nguyên tái tổ hợp P102 bằng Western blot

Kết quả Western blot cho thấy cả mẫu protein thể vùi và mẫu protein tinh sạch đều có liên kết đặc hiệu với kháng thể anti-His G-horseradish peroxidase ở băng protein kích thước khoảng 38 kDa, chứng tỏ rằng protein được biểu hiện chính là protein tái tổ hợp P102 với đuôi dung hợp (hình 6).



Hình 6. Western blot đánh giá tính đặc hiệu của kháng nguyên tái tổ hợp P102

M: Marker PageRuler[™] (Thermo Scientific), 1: Mẫu protein thể vùi, 2: Mẫu protein đã được tinh sạch.

IV. KẾT LUẬN

Đoạn gen mã hóa cho kháng nguyên P102 của *M. hyopneumoniae* đã được tạo dòng và biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3). Đoạn gen mã hóa kháng nguyên P102 có chiều dài 912 bp, tương đồng 99% so với trình tự đoạn gen mã hóa kháng nguyên P102 đã được công bố trên GenBank (mã số AE017243.1), và mã hóa tạo chuỗi polypeptide dài 304 amino acid, có độ tương đồng 100% với trình tự công bố trên GenBank (mã số AAZ44196.1). Kết quả tinh sạch và điện di SDS-PAGE cho thấy protein tái tổ hợp 6xHis-P102 có khối lượng phân tử khoảng 38 kDa.

Lời cảm ơn: Các tác giả cảm ơn Bộ Giáo dục và Đào tạo và Đại học Huế đã tài trợ cho nghiên cứu này thông qua đề tài cấp Bộ với mã số B2018-DHH-65.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Phước Ninh, Đỗ Tiến Duy, Nguyễn Tất Toàn, Nguyễn Ngọc Tuấn, Trần Thị Dân, 2006. Phân lập *Mycoplasma hyopneumoniae* và một số vi khuẩn liên quan đến bệnh hô hấp trên phổi heo. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*, 13 (3), tr. 12-15.
2. Đàm Văn Phải, Phạm Lan Hương, Đào công Duân, 2006. Kết quả thử nghiệm một số phác đồ điều trị bệnh viêm phổi do *Mycoplasma hyopneumoniae* gây ra lợn. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*, 13 (4), tr. 56-60.
3. Adams C., Pitzer J., Minion F.C., 2005. *In vivo* expression analysis of the P97 and P102 paralog families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infection and Immunity*. 73(11), pp. 7784-7787.
4. Galli V., Simionatto S., Marchioro S.B., Klabunde G.H.F., Conceição F.R., Dellagostin O.A., 2013. Recombinant secreted antigens from *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as a cocktail vaccine enhance the immune response of mice. *Clin. Vaccine Immunol*. 20(9), pp. 1370-1376.
5. Phung Thang Long, Le Quoc Viet, Le Viet Quan, Dong Huu Rin, Nguyen Xuan Hoa, Le Duc Thao, Le Dinh Phung, Nguyen Thi Thu Hien, Dinh Thi Bich Lan, 2019. Cloning and optimizing the culture parameters for expression of R1 and R2 repeat regions of P97 adhesin from *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli*. *Advances in Animal and Veterinary Science*. Volume 7. Issue 12, pp.1067-1075.
6. Seymour L.M., Jenkins C., Deutscher A.T., Raymond B.B., Padula M.P., Tacchi J.L., Bogema D.R., Eamens G.J., Woolley L.K., Dixon N.E., 2012. Mhp182 (P102) binds fibronectin and contributes to the recruitment of plasmin(ogen) to the *Mycoplasma hyopneumoniae* cell surface. *Cellular microbiology*. 14(1), pp. 81-94.
7. Simionatto S., Marchioro S.B., Galli V., Hartwig D.D., Carlessi R.M., Munari F.M., Laurino J.P., Conceição F.R., Dellagostin O.A., 2010. Cloning and purification of recombinant proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*. 69(2), pp. 132-136.
8. Simionatto S., Marchioro S.B., Galli V., Brum C.B., Klein C.S., Rebelatto R., Silva E.F., Borsuk S., Conceição F.R., Dellagostin O.A., 2012. Immunological characterization of *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant proteins. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 35(2), pp. 209-216.
9. Simionatto S., Marchioro S.B., Maes D., Dellagostin O.A., 2013. *Mycoplasma hyopneumoniae*: from disease to vaccine development. *Veterinary microbiology*. 165(3-4), pp. 234-242.
10. Tao Y., Shu J., Chen J., Wu Y., He Y., 2019. A concise review of vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Res. Vet. Sci*. 123: 144-152.
11. Thacker E.L., Thacker B.J., Boettcher T.B., Jayappa H., 1998. Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation and production induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. *J. Swine Health Prod*. 6(3): 107-112.
12. Thacker E.L., Halbur P.G., Ross R.F., Thanawongnuwech R., Thacker B.J., 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrom virus-induced pneumonia. *J. Clin. Microbiol*. 37(3): 620-627.

Ngày nhận 15-1-2021

Ngày phản biện 30-3-2021

Ngày đăng 1-7-2021