



KHOA HỌC KỸ THUẬT Thú y

JOURNAL OF VETERINARY SCIENCE AND TECHNOLOGY

ISSN 1859 - 4751

Tập XXVIII • Số 2 - 2021

HỘI THÚ Y VIỆT NAM
VIETNAM VETERINARY ASSOCIATION

MỤC LỤC

NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

- TRẦN THỊ THANH HÀ, TRƯƠNG ANH ĐỨC, LÝ ĐỨC VIỆT, HOÀNG VĂN TUẤN, NGUYỄN THỊ CHINH, ĐẶNG THỊ KIỀU ANH, NGUYỄN THẾ VINH, HOÀNG THỊ NHUNG và cs.
Phân lập virus gây bệnh viêm da nổi cục (lumpy skin disease - LSD) ở bò trên tế bào dòng Madin-Darby bovine kidney (MDBK) 5
- LÊ THÀNH DUY, ĐÀO DUY TÙNG, BÙI NGỌC ANH, PHẠM THỊ HUÊ, NGÔ THỊ MINH QUYÊN, KIỀU ANH MINH, HOÀNG ĐỨC TRUNG, VŨ THỊ THANH và cs.
Xác định genotype và phân tích phả hệ di truyền của virus viêm gan E đang lưu hành trên lợn tại Bắc Giang và Nghệ An 13
- NGUYỄN CHÉ THANH, NGUYỄN QUỲNH NHƯ, LẠI CÔNG DANH, ĐỖ TIẾN DUY
Một số đặc điểm của bệnh dịch tả heo châu Phi qua khảo sát diễn biến ở các ổ dịch 21
- TRƯƠNG THỊ QUÝ DƯƠNG, TRẦN THỊ NHẬT, TRƯƠNG THỊ HƯƠNG GIANG, JOHN ELMERDAHL OLSEN, MAHUTON GILDAS HOUNMANOU, ANDERS DALSGAARD và cs.
Kết quả nghiên cứu kiểu hình và kiểu gen kháng kháng sinh của vi khuẩn *Escherichia coli* sản sinh ESBL phân lập từ chất thải lợn 30
- VÕ THÀNH THÌN, LÊ ĐÌNH HẢI, ĐẶNG VĂN TUẤN
Khả năng miễn cảm kháng sinh của vi khuẩn *Riemerella anatipestifer* phân lập từ vịt mắc bệnh nhiễm trùng huyết ở Việt Nam 38
- KIM VĂN VẠN, LÊ VIỆT DŨNG, TRƯƠNG ĐÌNH HOÀI
Ảnh hưởng của beta-glucan và một số chất bổ sung lên sinh trưởng, tỷ lệ sống và sức đề kháng bệnh do vi khuẩn *Flavobacterium columnare* trên cá rô phi giồng (*Oreochromis niloticus*) 45
- HUỲNH VĂN CHƯÔNG, ĐẶNG THANH LONG, HOÀNG THỊ KIM HỒNG, PHẠM TRÍ THUẬN
Tạo dòng và biểu hiện gen *trh* (*thermostable direct hemolysin-related hemolysin*) của *Vibrio parahaemolyticus* mã hóa kháng nguyên gây dung huyết tổ không bền nhiệt trên cá hồng Mỹ 52
- NGUYỄN BÁ TIẾP, LÊ VĂN LINH, NGUYỄN THỊ MINH PHƯƠNG, TRẦN THỊ ĐỨC TÁM
Đặc điểm hình thái túi Fabricius của vịt Cổ Lũng từ 3 đến 9 tuần tuổi 60
- PHAN THỊ HỒNG PHÚC, DƯƠNG THỊ HỒNG DUYÊN
Bệnh do *Leucocytozoon* ở vịt tại tỉnh Thái Nguyên 66
- TRƯƠNG ĐÌNH HOÀI, ĐOÀN VĂN VŨNG, ĐOÀN THỊ NINH, NGUYỄN THỊ HƯƠNG GIANG
Điều trị giun tròn *Camallanus anabantis* ký sinh trên cá rô đồng (*Anabas testudineus*) bằng fenbendazole 71

NÂNG CAO - THAM KHẢO

- VŨ THỊ THU TRÀ, HOÀNG MINH ĐỨC, CAM THỊ THU HÀ, PHẠM HỒNG NGÂN
Một số phương pháp phát hiện vi khuẩn gây bệnh truyền qua thực phẩm 77
- VÕ VĂN NHA, LÊ HỒNG DUYỆT, TRẦN THỊ LƯU
Kiểm soát sức khỏe tôm thẻ chân trắng trong mô hình nuôi trên cát bằng nước biển ven bờ 84

TRAO ĐỔI KHKT - HOẠT ĐỘNG NGÀNH

- CỤC THÚ Y
Tình hình dịch bệnh và kết quả công tác phòng chống dịch bệnh năm 2020 của Cục Thú y 86
- NGUYỄN NGỌC SƠN
Điểm nhấn công tác phát triển chăn nuôi và phòng chống dịch bệnh năm 2020 và giải pháp trong thời gian tới tại Hà Nội 95
- NGUYỄN VĂN HÙNG
Xây dựng, phát triển Hội gắn với phát triển chăn nuôi bền vững và phòng chống dịch bệnh có hiệu quả 97

TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GEN *TRH* (THERMOSTABLE DIRECT HEMOLYSIN-RELATED HEMOLYSIN) CỦA *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* MÃ HÓA KHÁNG NGUYÊN GÂY DUNG HUYẾT TỔ KHÔNG BỀN NHIỆT TRÊN CÁ HỒNG MỸ

Huỳnh Văn Chương¹, Đặng Thanh Long¹,
Hoàng Thị Kim Hồng², Phạm Trí Thuận³

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tạo dòng và biểu hiện thành công gen *trh* của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* phân lập được trên cá hồng Mỹ bị bệnh lở loét, nuôi ở vùng ven biển Thừa Thiên-Huế. Vùng gen mã hóa tạo kháng nguyên độc tố gây dung huyết không bền nhiệt *trh* có kích thước 462 bp (bao gồm bộ ba mở đầu ATG và bộ ba kết thúc TGA), tương đồng 100% với trình tự gen được công bố trên GenBank (mã số KP836471.1). Vùng gen *trh* mã hóa tạo chuỗi polypeptide hoàn chỉnh dài 154 amino acid và tương đồng 100% với chuỗi polypeptide được công bố trên GenBank (mã số ALZ44850). Kết quả phân tích điện di SDS cho thấy protein dung hợp 6xHis-TRH có khối lượng phân tử xấp xỉ khoảng 21kDa (bao gồm 3,7 kDa đuôi dung hợp 6xHis).

Từ khóa: Gen *trh*, *Vibrio parahaemolyticus*, tỉnh Thừa Thiên-Huế.

Study on cloning and expressing *trh* gene (thermostable direct hemolysin-related hemolysin) of *Vibrio parahaemolyticus* encoding antigen caused thermostable hemolysin in snapper (*Sciaenops ocellatus*)

Huynh Van Chuong, Dang Thanh Long,
Hoang Thi Kim Hong, Pham Tri Thuan

SUMMARY

In this study, we have successfully cloned and expressed the *trh* gene encoding for a thermostable direct hemolysin-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*, which caused ulcer disease in snapper (*Sciaenops ocellatus*) raising in coastal areas of Thua Thien-Hue province. The full-length of *trh* gene was 462 bp (including start codon ATG and termination codon TGA). Similarity level of this gene sequence was 100% compared to the *trh* gene sequence published on the GenBank (accession number KP836471.1). The *trh* gene created an entire polypeptide sequence consisting of 154 amino acids and its similarity level was 100% compared to the polypeptide chain published on the GenBank (accession number ALZ44850). The result of analyzing SDS electrophoresis showed that 6xHis-TRH fusion protein had a molecular weight of approximately 21 kDa (including 3.7 kDa of 6xHis fusion tail).

Keywords: Gene *trh*, *Vibrio parahaemolyticus*, Thua Thien-Hue province.

I. MỞ ĐẦU

Bệnh xuất huyết lở loét ở cá do vi khuẩn *Vibrio* là một trong những bệnh thường gặp nhất và xuất hiện ở hầu hết các giai đoạn phát triển

của cá nuôi, gây thiệt hại lớn cho nghề nuôi cá ở nhiều nước [5]. 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 các vùng lưng, cá có thể chết trong vòng một tuần sau khi bị nhiễm bệnh. Theo, ước tính

¹ Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

² Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

³ Trường THCS và THPT Nguyễn Văn Cừ, Gia Lai

của Ngân hàng thể giới năm 1997, tổn thất do dịch bệnh gây ra cho ngành nuôi trồng thủy sản xấp xỉ 3 tỷ đô la Mỹ [10]. 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 [7]. 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 [3]. Do đó, việc xác định các loài liên quan đến *Vibrio* được phân lập từ môi trường biển đôi khi rất khó khăn [2]. Độc tố hay nội độc tố được cho là các phân tử chịu trách nhiệm về độc lực của các loài *Vibrio* [4]. Hemolysin là một độc tố có trong vi khuẩn *Vibrio* spp. 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* spp. gây bệnh và có nhiều vai trò khác nhau trong quá trình lây nhiễm [9]. Có 5 họ hemolysin đại diện trong *Vibrio* spp., trong đó có hai họ hemolysin không bền nhiệt (TLH) và hemolysin bền nhiệt TDH (thermostable direct hemolysin) đã được nhiều tác giả quan tâm nghiên cứu [13]. Nghiên cứu của Honda và cs. (1988) đã phát hiện một số chủng *V. parahaemolyticus* gây dung huyết kèm theo tích dịch nhưng có hiện tượng Kanagawa âm tính, hiện tượng này do yếu tố dung huyết liên quan đến TDH gây ra [6]. TRH (tdh-related hemolysin) là loại độc tố gây dung huyết không bền nhiệt, biến tính ở 60°C trong 10 phút và cũng có cơ chế gây độc cho tế bào tương tự TDH [12].

Mục đích của nghiên cứu này là tạo dòng và biểu hiện thành công gen *trh* của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* phân lập từ cá hồng Mỹ lở loét nuôi ở vùng ven biển Thừa Thiên-Huế trong tế bào vật chủ *E. coli* BL21 (DE3) ở dạng dung hợp tái tổ hợp để tạo kháng nguyên *trh* có thể hỗ trợ cho các nghiên cứu sâu hơn về sản xuất ứng viên vacxin hay kit chẩn đoán sớm bệnh do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây ra.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu nghiên cứu

Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được phân lập và định danh 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 vacxin, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế cung cấp. Vector nhân dòng pGEM-T (Promega), vector biểu hiện pET200/D-TOPO (Invitrogen), chủng *E. coli* TOP10, *E. coli* BL21 (DE3); hóa chất tách chiết ADN và một số môi trường, vật liệu thường dùng trong phòng thí nghiệm như: Yeast extract (Difco, Mỹ), Trypton (Difco, Mỹ), EDTA (Sigma, Mỹ), Acid acetic (Merk, Đức), Kanamycin, Ampicillin (Merk, Đức), X-gal (Sigma, Mỹ), Agarose (Sigma, Mỹ), cồn tuyệt đối (Prolabo, Pháp), IPTG (BioRad, Mỹ).

Môi trường LB (0,5% dịch chiết nấm men; 1% tryptone và 1% NaCl), môi trường SOB (2% peptone; 0,5% dịch chiết nấm men; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂ và 10 mM MgSO₄), môi trường SOC (môi trường SOB và 20 mM glucose), môi trường TB (1,2% peptone; 2,4% dịch chiết nấm men; 72 mM K₂HPO₄; 17 mM KH₂PO₄ và 0,4% glycerol), môi trường YJ (2% glycerol; 1,5% tryptone; 2% dịch chiết nấm men; 0,25% K₂HPO₄.12H₂O; 0,016% KH₂PO₄; 0,05% NaCl và 0,025% MgSO₄.7H₂O).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số từ vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được tách chiết theo mô tả của Panicker và cs. (2004) có sự thay đổi cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm [8]. Sinh khối tế bào vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được thu nhận từ 1 mL huyền dịch nuôi cấy ở 35°C trong 18 giờ bằng máy ly tâm lạnh (Máy ly tâm lạnh, Model: 5417R) 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 sodium dodecyl sulfate (SDS) 10% (khối lượng/

thể tích) và 5 μ L của proteinase K (20 mg/mL; Sigma). Sau 1 giờ ủ, tiếp tục bổ sung 100 μ L NaCl 5M, 80 μ L Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)-hòa tan trong NaCl (10% CTAB trong 0,7 M NaCl) để tạo phức với polysaccharides. 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 μ l) 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 (1,5 mL) mới và tiếp tục bổ sung một thể tích tương đương hỗn hợp phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1), lắc đều và ly tâm 12.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C (lặp lại bước này một lần nữa). Lấy 350 μ L dịch nổi chứa DNA phía trên và kết tủa DNA bằng ethanol 100%, để nhiệt độ -20 °C trong 60 phút. Thu cặn DNA bằng cách ly tâm 15.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C; rửa DNA bằng ethanol 70%. Sau đó, ly tâm 12.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C; loại bỏ hoàn toàn ethanol; giữ cặn DNA, để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng; hòa tan DNA thu được bằng 50 μ L TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM Na₂EDTA.H₂O, pH=7,2). DNA tổng số của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* 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 (EtBr) (0,5 μ g/L).

2.2.2. Phương pháp PCR phân lập gen *trh*

DNA tổng số thu được sau khi tách chiết từ vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR phân lập gen *trh* mã hóa tạo kháng nguyên độc tố TRH với cặp mồi đặc hiệu được thiết kế dựa trên trình tự nucleotide được đăng ký trên GenBank có mã số KP836471.1 thông qua phần mềm Primer3plus [12]. Thành phần nucleotide của cặp mồi đặc hiệu cho gen: Vp_{trh}F: 5'-CACCATGAAAC TAAACTCTACTTTGC-3', Vp_{trh}R: 5'-TCATCCAAATACGTTACACTTACTTGGC-3'. Thành phần phản ứng PCR gồm có: 25 ng DNA khuôn; 12,5 μ L 2 \times PCR master mix (2,4 mM dNTP mỗi loại; 0,3 đơn vị Taq DNA

polymerase; 10 pmol Vp_{trh}F; 10 pmol Vp_{trh}R) và bổ sung nước cất vô trùng để đạt thể tích phản ứng là 25 μ l. 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, 56°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 0,8%; nhuộm màu bằng EtBr (0,5 μ g/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 và gen sẽ được gắn vào vector pGEM®-T Easy theo phương pháp tạo dòng TA để tạo thành vector tái tổ hợp pGEM-T Easy/*trh*. Thành phần phản ứng gắn được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất bao gồm: 50 ng vector pGEM®-T Easy, 5 μ L đệm gắn 2X, 3 đơn vị enzyme T₄ DNA ligase, 23,2 ng sản phẩm PCR sau khi tinh sạch và bổ sung nước vô trùng để đạt thể tích cuối cùng 10 μ l, 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 *trh* 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 tái tổ hợp được sàng lọc bằng cách 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 *trh* 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 Ngân hàng Gen (NCBI) bằng công cụ BLAST.

2.2.4. Phương pháp tạo dòng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET/trh

Vector tái tổ hợp pGEM-T Easy/trh được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR thu nhận vùng gen mã hóa tạo kháng nguyên TRH với cặp mồi VptrhF: 5'- CACCATGAAAC-TAAACTCTACTTTGC -3'; VptrhR: 5'-TCATCCAAATACGTTACACTTACTTGGC-3'. Trình tự CACC thêm vào ở đầu 5' giúp tạo dòng định hướng cho sản phẩm PCR trong vector và được thiết kế bổ sung cho phần lồi ra GTGG của vector pET200/D-TOPO. Thành phần phản ứng PCR bao gồm 1 μ L vector tái tổ hợp pGEM-T Easy/trh (30 ng), 20 pmol mỗi mồi, 5 μ L đệm PCR 10x, 1 μ L dNTP (10 pmol/ μ L), 1 μ L enzyme pfu (5U/ μ L), 40 μ L nước cất vô trùng, thực hiện chu trình nhiệt như trình bày trên. Sản phẩm PCR từ vector tái tổ hợp pGEM-T Easy/trh được kiểm tra trên gel agarose và tinh sạch, tiến hành gắn vào vector pET và được hóa biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3), trải trên môi trường LB có bổ sung 100 μ g/mL kanamycin. Các dòng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pGEM-T Easy/trh được sàng lọc bằng kỹ thuật PCR trực tiếp từ khuẩn lạc với cặp mồi VptrhF và VptrhR, đồng thời tách chiết, tinh sạch plasmid và điện di sản phẩm trên gel agarose.

2.2.5. Cầm ứng biểu hiện protein TRH tái tổ hợp

Chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET/trh được nuôi cấy lác ở 37°C trong môi trường YJ chứa kháng sinh kanamycin (100 μ g/mL). Sau 16 giờ nuôi cấy, vi khuẩn được cấy chuyển với tỷ lệ 1:20 (v/v) và tiếp tục nuôi cấy lác ở 37°C, tốc độ lác 200 vòng/phút. Đến khi OD₆₀₀ của vi khuẩn đạt giá trị 0,9–1,0, chất IPTG được bổ sung vào ống dịch vi khuẩn sao cho nồng độ cuối đạt 1 mM. Tiếp tục lác mẫu ở 37°C, sau 8 giờ cầm ứng, tiến hành thu sinh khối tế bào và phá vỡ màng tế bào bằng sóng siêu âm để thu protein tổng số nội bào có chứa protein dung hợp 6xHis-TRH. Sự biểu hiện của protein tái tổ hợp được xác nhận bằng phương pháp SDS-PAGE, đồng thời thực hiện với mẫu đối chứng âm là mẫu dịch pha tổng số của *E. coli* BL21 (DE3) không mang vector tái tổ hợp.

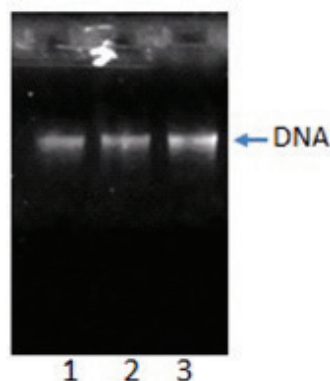
2.2.6. Xử lý số liệu

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

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* 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. Vì thế, có thể sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR phân lập gen *trh*.

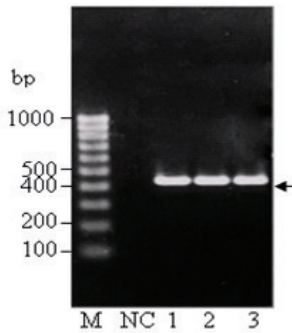


Hình 1. Kết quả tách chiết DNA tổng số trên gel agarose 0,8%

Giếng 1-3: Số lần lặp lại khi tách chiết DNA tổng số từ vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.

3.2. Phân lập gen *trh*

Gen *trh* mã hóa tạo kháng nguyên độc tố TRH của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* 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 466 bp (bao gồm cả 4 nucleotide CACC được thiết kế ở đầu 5' của mồi xuôi), chứng tỏ toàn bộ quy trình thực hiện phản ứng PCR là chính xác.



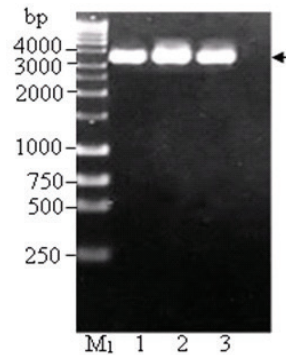
Hình 2. Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu cho vùng gen *trh* của vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

Giếng M: khối lượng thang chuẩn DNA (100-1000 bp, Biobase); giếng NC: đối chứng âm; giếng 1-3 sản phẩm PCR lặp lại 3 lần của gen *trh*.

3.3. Kết quả tạo dòng và phân tích trình tự gen *trh*

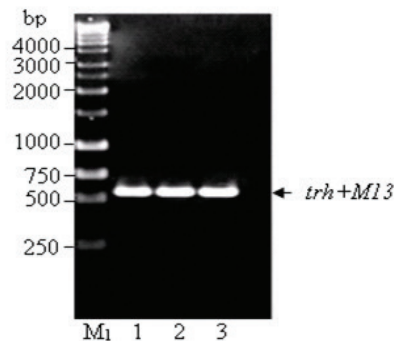
Sản phẩm PCR thu được sau khi tinh sạch gen *trh* có gắn thêm adenine (dA) vào đầu 3' (do đặc tính của enzyme Taq DNA polymerase) nhằm tạo liên kết bổ sung với thymidine (dT) đã được thiết kế trong vector pGEM[®]-T Easy bằng phương pháp tạo dòng (TA-cloning). Kết quả gắn vào vector và biến nạp vào tế bào vật chủ *E. coli* TOP10 thể hiện thông qua tách chiết plasmid tái tổ hợp và điện di trên gel agarose 0,8% trên hình 3 cho thấy chỉ có một băng duy nhất, đậm, rõ nét, có kích thước khoảng 3490 bp (bao gồm kích thước của vector pGEM[®]-T Easy là 3015 bp, kích thước của gen *trh* khoảng 462 bp và 4 nucleotide CACC được thiết kế bổ sung ở đầu 5' mồi xuôi) (hình 3). Sự hiện diện của gen *trh* 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-T Easy/*trh*. Kết quả cho thấy đã xuất hiện băng DNA có kích thước khoảng (666 bp) (bao gồm kích thước của gen 462 bp, 4 nucleotide CACC được thiết kế bổ sung ở đầu 5' mồi xuôi 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 *trh* vào vector pGEM[®]-T Easy và biến nạp được vào tế bào vật chủ *E. coli* chủng TOP10.

Plasmid tái tổ hợp này được phân tích trình tự nucleotide và so sánh với các trình tự đã công bố trên Ngân hàng Gen.



Hình 3. Ảnh điện di kiểm tra plasmid tái tổ hợp pGEM-T Easy/*trh*

Giếng M1 khối lượng thang chuẩn DNA (250-10.000 bp, Promega); giếng 1-3: sản phẩm plasmid tái tổ hợp pGEM/*trh* tách từ 3 khuẩn lạc khác nhau.



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

Giếng M1: khối lượng thang chuẩn DNA (250-10.000 bp, Promega); giếng 1, 2 và 3: sản phẩm PCR của gen *trh* với cặp mồi M13.

Kết quả phân tích trình tự cho thấy đoạn gen phân lập được có kích thước 462 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 Ngân hàng Gen với mã số KP836471.1, trình tự này mã hóa tạo một chuỗi peptide suy diễn hoàn chỉnh

và liên tục bao gồm 154 amino acid (không bao gồm bộ ba kết thúc TAA) và tương đồng 100% với trình tự amino acid công bố với mã số ALZ44850 (hình 5). Như vậy chúng tôi có thể khẳng định rằng đã tách dòng

thành công gen *trh* mã hóa kháng nguyên độc tố không bền nhiệt TRH của vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, một trong những tác nhân gây nên bệnh xuất huyết lở loét trên cá hồng Mỹ thu tại vùng ven biển Thừa Thiên-Huế.

CDS: Putative 1	1	M K L K L Y F A F S L L L A S I F S V S	
Trh	1	ATGAACTAAAACCTACTCTTTCAGTTTCAGTTGCTATTGGCTTCGATAITTTTCAGTAICT	60
KP836471.1	1	60
CDS:truncated TDH-re	1	M K L K L Y F A F S L L L A S I F S V S	
CDS: Putative 1	21	K S F A I D L P S I P F P S P G S D E L	
Trh	61	AAATCAITTCGGATTGACCTACCATCCATACCTTTTCTCTCCAGGTCGGATGAGTCA	
120			
KP836471.1	61	
120			
CDS:truncated TDH-re	21	K S F A I D L P S I P F P S P G S D E L	
CDS: Putative 1	41	L F V V R N T T I K T E S P V N A I V D	
Trh	121	CTATTTGTCGTTAGAAATACAACATAAAAACTGAATCACCAGTTAACGCAATCGTGTAT	
180			
KP836471.1	121	
180			
CDS:truncated TDH-re	41	L F V V R N T T I K T E S P V N A I V D	
CDS: Putative 1	61	D Y W T N R N I K R K P Y K S V H G Q S	
Trh	181	GACTACTGGACAAACCGAAACATAAAAACGAAAACCATATAAAAAGCGTTCACGGTCAATCT	
240			
KP836471.1	181	
240			
CDS:truncated TDH-re	61	D Y W T N R N I K R K P Y K S V H G Q S	
CDS: Putative 1	81	I F T T S G S K W L S A Y M T V N I N G	
Trh	241	ATTTTCAGGACTTCAGGCTCAAATGGTTAAGCGCCTATATGACGGTAAATATTAATGGA	
300			
KP836471.1	241	
300			
CDS:truncated TDH-re	81	I F T T S G S K W L S A Y M T V N I N G	
CDS: Putative 1	101	N N Y T M A A L S G Y K D G L S T V F T	
Trh	301	AATAACTACACATGGCTGCTCTTTCTGGCTATAAAGATGGCCTTTCACCGGCTTCCACA	
360			
KP836471.1	301	
360			
CDS:truncated TDH-re	101	N N Y T M A A L S G Y K D G L S T V F T	
CDS: Putative 1	121	K S E K T S L N Q N Y S S V S D F V G E	
Trh	361	AAATCAGAAAAAACAAGCCTAAATCAGAACTATTCTTCTGTTAGTGAITTCGTTGGTGA	
420			
KP836471.1	361	
420			
CDS:truncated TDH-re	121	K S E K T S L N Q N Y S S V S D F V G E	
CDS: Putative 1	141	N E E S L P S K C N V F G *	
Trh	421	AATGAGAATCAITTCGCAAGTAAAGTAACTGTAACGTAATTGGATGA	462
KP836471.1	421	462
CDS:truncated TDH-re	141	N E E S L P S K C N V F G	

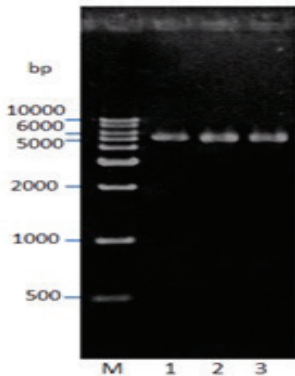
Hình 5. Mức độ tương đồng trình tự nucleotide giữa gen *trh* đã phân lập và gen *trh* được công bố trên GenBank (KP836471.1) và amino acid suy diễn của nó (ALZ44850)

3.4. Kết quả tạo dòng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET/*trh*

Plasmid tái tổ hợp pGEM/*trh* được sử dụng làm khuôn mẫu thực hiện phản ứng PCR thu nhận gen mục tiêu với cặp mồi đặc hiệu như trình bày ở trên nhằm biểu hiện trong tế bào vật chủ *E. coli* BL21 (DE3) thông qua hệ thống

biểu hiện là vector pET/200D-TOPO. Các khuẩn lạc tái tổ hợp 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 *trh* với cặp mồi đặc hiệu (hình 6).

Phân tích trên gel agarose 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 6200 bp (bao gồm kích thước của vector là 5741 bp, kích thước đoạn gen *trh* là 462 bp và 4 nucleotide được thiết kế ở đầu 5' của môi 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).



Hình 6. Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm plasmid pET/trh

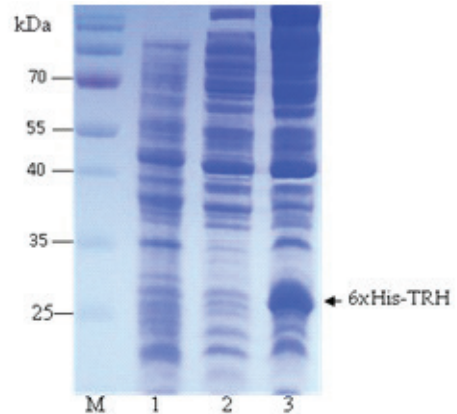
Giếng M: khối lượng thang chuẩn DNA (250 -10.000 bp, Promega), giếng 1- 3: sản phẩm plasmid tái tổ hợp chứa gen *trh* tách từ 3 khuẩn lạc.

3.5. Kết quả biểu hiện gen *trh*

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 gây dung huyết không bền nhiệt TRH được kiểm tra bằng chạy điện di trên gel polyacrylamide 15% có bổ sung SDS (hình 7).

Kết quả điện di SDS cho thấy xuất hiện vạch protein đậm có kích thước khoảng 21 kDa ở giếng số 2, 3 (bao gồm 3,7 kDa đuôi dung hợp 6xHis của vector). Trong khi đó không xuất hiện vạch này ở mẫu đối chứng là chủng *E. coli* không mang vector tái tổ hợp ở giếng 1, 2. Như vậy, sơ bộ chúng tôi có thể kết luận protein tái

tổ hợp TRH của *V. parahaemolyticus* đã được biểu hiện thành công trong vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3). Điều này đã chứng minh qua kết quả giải trình của gen *trh* và đã gắn thành công trong vector biểu hiện pET200/D-TOPO và kết quả điện di biến tính protein bằng phương pháp SDS-PAGE.



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

Giếng M: khối lượng thang chuẩn protein (10–170 kDa, BioBase), giếng 1, 2: protein thu được từ tế bào *E. coli* không mang vector tái tổ hợp, giếng 3: dịch protein có chứa độc tố gây dung huyết không bền nhiệt dung hợp 6xHis-TRH.

IV. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã phân lập thành công vùng gen *trh* mã hóa tạo kháng nguyên độc tố gây dung huyết không bền nhiệt TRH của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* phân lập được trên cá hồng Mỹ mắc bệnh lở loét nuôi lồng ven biển Thừa Thiên-Huế. Vùng gen mã hóa tạo kháng nguyên độc tố gây dung huyết không bền nhiệt TRH có kích thước 462 bp, vùng gen này mã hóa tạo thành chuỗi peptide hoàn chỉnh và liên tục gồm 154 amino acid.

Trình tự gen *trh* đã được biểu hiện trên hệ thống vector pET 200/D-TOPO trong vật chủ *E. coli* BL21 (DE3) thu được protein dung hợp 6xHis-TRH có khối lượng phân tử khoảng 21kDa. Sản phẩm nghiên cứu của chúng tôi sẽ làm nguyên liệu để sản xuất vacxin/ kit chẩn đoán và kháng thể sử dụng trong chẩn đoán,

phòng và trị bệnh xuất huyết lở loét trên cá hồng Mỹ do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* 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-03.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chatterjee, S., Haldar S., 2012. *Vibrio* related diseases in aquaculture and development of rapid and accurate identification methods. *J Marine Sci Res Dev SI*:002.
2. Egidius, E., 1987. Vibriosis : pathogenicity and pathology. *A review Aquaculture*, 67: p. 15–28.
3. Fraser, C., Hanage, W.P., Spratt, B.G., 2007. Recombination and the nature of bacterial speciation. *Science*, 26: p. 476-480.
4. Hendrikson, R.G., and Zenoble, R.D., 1983. Vibriosis in fish : a review. *Iowa State University Veterinarian*, 45: p. 25–28.
5. Harikrishnan R., Balasundaram, C. and Heo, M.S., 2010. Molecular studies, disease status and prophylactic measures in grouper aquaculture: Economic importance, diseases and immunology. *Aquaculture*, 309, pp. 1-14.
6. Honda T., Ni, Y. and Miwatani T., 1988. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infect Immun* 56, 961–965.
7. 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.
8. 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.
9. Shinoda, S., 1999. Protein toxins produced by pathogenic vibrios. *Journal of natural toxins* 8: p. 259–269.
10. 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 ed.*, Rome, Italy: NACA. Bangkok and FAO: p. 167-191.
11. 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.
12. Yeung P.S.M. and Boor K.J. , 2004. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. *Foodborne pathogens and disease*, 1(2), pp. 74-88.
13. Zhang, X.H., Austin, B., 2005. Haemolysins in *Vibrio* species. *Journal of Applied Microbiology*, 98: p. 1011–1019.

Ngày nhận 15-9-2020

Ngày phản biện 3-11-2020

Ngày đăng 1-3-2021