



# KHOA HỌC KỸ THUẬT Thú y

JOURNAL OF VETERINARY SCIENCE AND TECHNOLOGY

ISSN 1859 - 4751

**PHẦN DÀNH RIÊNG CHO CHUYÊN ĐỀ:**

**CÁC BÀI BÁO NGHIÊN CỨU KHOA HỌC  
HỘI NGHỊ KHOA HỌC CHĂN NUÔI THÚ Y TOÀN QUỐC  
(Lần thứ IV)**

**Tập XXVIII • Số 9 - 2021**

**HỘI THÚ Y VIỆT NAM  
VIETNAM VETERINARY ASSOCIATION**

## MỤC LỤC

### NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

- NGUYỄN THANH THỦY, ĐINH THỊ BÍCH LÂN, LÊ VIỆT QUÂN, PHÙNG THẮNG LONG  
Tạo dòng và biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên P42 từ *Mycoplasma hyopneumoniae* trong *Escherichia coli* (BL21) 5
- NGUYỄN MINH THƯƠNG, NGUYỄN KHÁNH THUẬN, TRẦN QUỐC PHI, LÝ THỊ LIÊN KHAI  
Khảo sát ảnh hưởng của một số chế phẩm sinh học lên sự tăng trưởng và điều trị bệnh do vi khuẩn *Salmonella typhimurium* trên gà nòi lai 13
- LÊ HỒNG NGHỊ, NGUYỄN KHÁNH THUẬN, TRẦN THỊ LỆ TRIỆU, LÝ THỊ LIÊN KHAI, TRẦN NGỌC BÍCH  
Sự lưu hành và đề kháng kháng sinh của vi khuẩn *Enterohaemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) O45, O121, O157 trên bò tại huyện Ba Tri, tỉnh Bến Tre 21
- VÕ THÀNH THÌN, ĐẶNG VĂN TUẤN, LÊ ĐÌNH HẢI  
Một số đặc điểm sinh học và khả năng gây bệnh thực nghiệm của vi khuẩn *Riemerella anatipestifer* phân lập từ vịt mắc bệnh nhiễm trùng huyết ở Việt Nam 29
- NGUYỄN KHÁNH THUẬN, LÂM NGỌC ĐIỆP, TIÊU HỒNG PHÚC, LÝ THỊ LIÊN KHAI  
Sự lưu hành các chủng phổ biến và gen độc lực *stx2*, *eae* của vi khuẩn *Escherichia coli* phân lập trên gà tại huyện Tam Bình, tỉnh Vĩnh Long 39
- NGUYỄN ĐỨC TÂN, NGUYỄN THỊ THẨM, LÊ LẬP  
Nghiên cứu sản xuất vaccin giải độc tố CLOSTOXOI I.VAC phòng bệnh viêm ruột hoại tử do vi khuẩn *Clostridium perfringens* gây ra trên bò, dê, cừu 48
- PHẠM HOÀNG SƠN HÙNG, HỒ THỊ DUNG, TRẦN NGUYỄN THẢO  
Sự lưu hành và một số đặc điểm dịch tễ của bệnh viêm đường hô hấp mạn tính (CRD) trên gà nuôi tập trung tại Thừa Thiên - Huế 56
- NGÔ THỊ NGỌC TRÂM, NGUYỄN THỊ MỸ DUYÊN, NGUYỄN QUANG HỢP, NGUYỄN MINH NAM, ĐỖ TIÊN DUY  
Đặc điểm di truyền của virus dịch tả heo châu Phi phân lập được từ các ổ dịch tại một số tỉnh phía Nam từ 2019 đến 2020 67
- HUỖNH NGỌC TRANG, VÕ BẢO DUY, PHẠM HUỖNH KHIẾT TÂM, HỒ THỊ VIỆT THU  
Khảo sát miễn dịch sau tiêm phòng vaccin đại trên đàn chó ở huyện Phú Tân, tỉnh An Giang 76
- ĐẶNG THỊ MAI LAN, ĐỖ ĐỨC THÀNH, ĐOÀN THỊ THANH HƯƠNG  
Giải mã gen kháng nguyên H, phân tích đặc điểm phân tử và xác định phả hệ nguồn gốc của Canine distemper virus gây bệnh Ca-rê ở chó tại Hà Nội '81
- NGUYỄN VĂN PHƯƠNG, BÙI KHÁNH LINH, NGUYỄN THỊ HOÀNG YẾN, NGUYỄN THỊ HỒNG CHIÊN, NGUYỄN THỊ NHIÊN, DƯƠNG ĐỨC HIẾU, NGUYỄN HUYỀN THƯỜNG  
Tình hình mắc bệnh ghê tai do *Otodectes cynotis* gây ra ở mèo và thử nghiệm phác đồ điều trị 90

### TRAO ĐỔI KHKT - HOẠT ĐỘNG NGÀNH

- NGUYỄN XUÂN HÒA, NGUYỄN VĂN CHÀO, PHẠM HỒNG SƠN  
Nghiên cứu khoa học của Bộ môn Thú y, Khoa Chăn nuôi Thú y, Trường Đại học Nông Lâm Huế giai đoạn 2015-2020 97

## CONTENTS

### SCIENTIFIC RESEARCH

- NGUYEN THANH THUY, DINH THI BICH LAN, LE VIET QUAN, PHUNG THANG LONG  
Cloning and expression of P42 antigen encoding gene from *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli* (BL21) 5
- NGUYEN MINH THUONG, NGUYEN KHANH THUAN, TRAN QUOC PHI, LY THI LIEN KHAI  
Study on effects of some probiotics on the growth and disease treatment caused by *Salmonella typhimurium* in the hybrid noi chickens 13
- LE HONG NGHI, NGUYEN KHANH THUAN, TRAN THI LE TRIEU, LY THI LIEN KHAI, TRAN NGOC BICH  
Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterohaemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) O45, O121, O157 in cattle in Ba Tri district, Ben Tre province 21
- VO THANH THIN, DANG VAN TUAN, LE DINH HAI  
Some biological characteristics and experimental pathogenicity of *Riemerella anatipestifer* isolated from duck suffering with septicemia in Viet Nam 29
- NGUYEN KHANH THUAN, LAM NGOC DIEP, TIEU HONG PHUC, LY THI LIEN KHAI  
Prevalence of common serotypes and *stx2*, *eae* pathogenic genes of *Escherichia coli* isolated from chickens in Tam Binh district, Vinh Long province 39
- NGUYEN DUC TAN, NGUYEN THI THAM, LE LAP  
Study on production of toxoid vaccine CLOSTOXOI I.VAC against necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens* in cattle, goat and sheep 48
- PHAM HOANG SON HUNG, HO THI DUNG, TRAN NGUYEN THAO  
The prevalence and epidemiological characteristics of chronic respiratory diseases in chicken raised at farms in Thua Thien - Hue province 56
- NGO THI NGOC TRAM, NGUYEN THI MY DUYEN, NGUYEN QUANG HOP, NGUYEN MINH NAM, DO TIEN DUY  
The genetic characteristics of African swine fever virus isolated from outbreaks in southern provinces of Viet Nam in 2019 - 2020 67
- HUYNH NGOC TRANG, VO BAO DUY, PHAM HUYNH KHIET TAM, HO THI VIET THU  
Survey on immunity of rabies vaccinated dogs in Phu Tan district, An Giang province 76
- DANG THI MAI LAN, DO DUC THANH, DOAN THI THANH HUONG  
H antigen gene decode, molecular characteristics analysis and original pedigree determination of Canine distemper virus caused Carre's disease in dog in Ha Noi 81
- NGUYEN VAN PHUONG, BUI KHANH LINH, NGUYEN THI HOANG YEN, NGUYEN THI HONG CHIEN, NGUYEN THI NHIEU, DUONG DUC HIEU, NGUYEN HUYEN THUONG  
Prevalence of *Otodectes cynotis* in domestic cats and experimental treatment regimen 90

### SCIENTIFIC AND TECHNICAL EXCHANGE - PROFESSIONAL ACTIVITIES

- NGUYEN XUAN HOA, NGUYEN VAN CHAO, PHAM HONG SON  
Scientific research of the Department of Veterinary medicine, Faculty of Animal science and Veterinary medicine, University of Agriculture and Forestry, Hue University in the period 2015-2020 97

# Nghiên cứu khoa học

## TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA KHÁNG NGUYÊN P42 TỪ *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* TRONG *ESCHERICHIA COLI* (BL21)

Nguyễn Thanh Thủy<sup>1</sup>, Đinh Thị Bích Lan<sup>1\*</sup>,  
Lê Việt Quân<sup>2</sup>, Phùng Thăng Long<sup>1</sup>  
\*Email: thuhuong@huaf.edu.vn

### TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tạo dòng và biểu hiện thành công gen mã hóa kháng nguyên P42 của *Mycoplasma hyopneumoniae* phân lập từ mẫu phổi của lợn thu thập tại tỉnh Thừa Thiên-Huế, Việt Nam. Gen mã hóa cho kháng nguyên P42 được tạo dòng và biểu hiện bởi vector pET200/D-TOPO trong tế bào *Escherichia coli* BL21 (DE3). Gen mã hóa kháng nguyên P42 đã được tạo dòng có chiều dài 1.119 bp, mã hóa một chuỗi polypeptide dài 372 amino acid, và tương đồng 100% với trình tự polypeptide của *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448 (từ vị trí amino acid thứ 229 đến 600) đã được công bố trên GenBank (mã số AAZ53444.1). Kết quả điện di trên SDS-PAGE cho thấy protein tái tổ hợp 6xHis-P42 có khối lượng phân tử khoảng 44 kDa. Kết quả kiểm tra tính đặc hiệu của protein tái tổ hợp cho thấy protein tái tổ hợp 6xHis-P42 có kết hợp đặc hiệu với kháng thể có trong huyết thanh của lợn nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Từ khóa: *Mycoplasma hyopneumoniae*, P42, tạo dòng, biểu hiện, protein tái tổ hợp.

### Cloning and expression of P42 antigen encoding gene from *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli* (BL21)

Nguyen Thanh Thuy, Dinh Thi Bich Lan,  
Le Viet Quan, Phung Thang Long

### SUMMARY

In this study, we successfully cloned and expressed the P42 antigen encoding gene of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolated from lung samples of pigs raising in Thua Thien-Hue province, Viet Nam. The P42 antigen encoding gene was cloned and expressed with vector pET200/D-TOPO in *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells. The cloned fragment of P42 antigen encoding gene had a length of 1,119 bp; encoding a polypeptide chain with 372 amino acid residues, and 100% similarity to the polypeptide chain of *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448 in GenBank (accession number AAZ53444.1). The results of SDS-PAGE electrophoresis showed that molecular weight of 6xHis-P42 recombinant protein was about 44 kDa. The results of testing the specificity of the recombinant protein showed that the 6xHis-P42 recombinant protein had a specific linkage with antibodies in the serum of pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*, P42, cloning, expression, recombinant protein.

<sup>1</sup> Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

<sup>2</sup> Học viên cao học Đại học Okayama, Nhật Bản

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

*Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) là vi khuẩn gây bệnh suyễn (hay còn gọi là bệnh viêm phổi địa phương) trên lợn. Đây là một bệnh hô hấp mạn tính ảnh hưởng đến lợn trên toàn thế giới [3, 11]. Đặc trưng của bệnh là tỷ lệ mắc bệnh rất cao, nhưng tỷ lệ chết thấp. Tuy nhiên, thiệt hại do bệnh gây ra thường rất lớn vì lợn bị bệnh còi cọc, chậm lớn, lớn không đồng đều, tiêu tốn thức ăn, thời gian vỗ béo kéo dài dẫn đến giảm năng suất thịt và lợi nhuận [1]. Mặt khác, *M. hyopneumoniae* tấn công vào đường hô hấp trên của lợn, làm tổn thương hệ thống lông rung của đường hô hấp, thúc đẩy quá trình xâm nhập và tạo điều kiện cho sự kết hợp của *M. hyopneumoniae* với các loại vi khuẩn khác [2]. Bệnh có thể chẩn đoán sơ bộ căn cứ vào một số triệu chứng và bệnh tích đặc trưng, tuy nhiên chẩn đoán trong phòng thí nghiệm để xác định *M. hyopneumoniae* mới thực sự có ý nghĩa trong giám sát dịch bệnh.

Hiện nay, tiêm chủng được xem là chiến lược tiết kiệm chi phí nhất để kiểm soát và phòng ngừa căn bệnh này [7]. Các loại vaccin bất hoạt hiện có làm giảm các tổn thương phổi và các dấu hiệu lâm sàng cho lợn con được tiêm chủng, cải thiện tăng trọng hàng ngày và hệ số chuyển hóa thức ăn, nhưng các vaccin này chỉ cung cấp được sự bảo hộ một phần và không ngăn chặn được sự xâm nhập của *M. hyopneumoniae* vào trong phổi; cũng như chi phí sản xuất vaccin này rất cao do quá trình nuôi cấy *in vitro* *M. hyopneumoniae* phức tạp [3, 10]. Do đó, việc nghiên cứu các vaccin mới hiệu quả và an toàn đang được tích cực tiến hành, đặc biệt là vaccin tiểu đơn vị và DNA tái tổ hợp [9, 11].

Trong một nghiên cứu trước đây, so sánh trình tự nucleotide cho thấy gen mã hóa P42 có thể là một phần của gen mã hóa P65. Phân tích sâu hơn đã chứng minh rằng P42 thực sự là một protein sốc nhiệt biểu hiện với số lượng lớn, được phơi bày trên bề mặt mầm bệnh và liên quan đến cơ chế sinh bệnh của *M. hyopneumoniae* [5]. Nhiều nghiên cứu đã kết luận rằng P42 có khả năng sinh đáp ứng miễn dịch cao, có thể ngăn chặn

sự phát triển của *M. hyopneumoniae* và là ứng viên cho nghiên cứu sản xuất vaccin tái tổ hợp [4, 5, 6, 11]. Nghiên cứu của Galli và cs. (2012) đã kiểm tra khả năng sinh đáp ứng miễn dịch ở chuột đối với các kháng nguyên tái tổ hợp P37, P42, P46 và P95 từ *M. hyopneumoniae*. Kết quả ELISA cho thấy huyết thanh từ chuột được tiêm kháng nguyên tái tổ hợp P42 có khả năng liên kết đặc hiệu với protein nguyên thể từ *M. hyopneumoniae* cao nhất. Ngoài ra, kháng nguyên tái tổ hợp P42 cũng kích thích sản sinh IgG2a và INF khi được tiêm vào cơ thể chuột. Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành nghiên cứu sản xuất kháng nguyên P42 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 tại Việt Nam.

## II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

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

- Vector pET200/D-TOPO (Invitrogen), chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen).

- QIAamp DNA mini kit (Qiagen), EZ-10 spin column DNA gel extraction miniprep kit (Biobasic), Isolate II plasmid mini kit, Bio 52056 (Bioline), ProBond™ purification system kit (Thermo Fisher Scientific).

### 2.2. Nội dung nghiên cứu

- Phân lập gen mã hóa kháng nguyên P42 từ các mẫu dịch phổi của lợn nghi bị nhiễm *M. hyopneumoniae*

- Tạo dòng gen mã hóa kháng nguyên P42

- Biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên P42

- Kiểm tra tính đặc hiệu của kháng nguyên tái tổ hợp P42.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Phân lập gen mã hóa kháng nguyên P42

Các mẫu dịch phổi của lợn nghi bị nhiễm *M. hyopneumoniae* được thu thập từ các đàn lợn nuôi trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên - Huế. DNA tổng số được tách chiết và tinh sạch từ dịch nuôi tăng sinh vi khuẩn có trong mẫu phổi bằng kit QIAamp DNA mini (Qiagen), và được sử dụng làm nguyên liệu cho phản ứng khuếch đại đoạn gen mã hóa kháng nguyên P42 với cặp mồi đặc hiệu đã được thiết kế trong nghiên cứu của Galli và cs. [6]:

- Mồi xuôi P42F: 5'-CACCATGGCGCTTA CAAGACTTAA-3'

- Mồi ngược P42R: 5'-TGATTAATCCT-GCTT GATTTCAGCAT-3'

Thành phần phản ứng PCR gồm có 1  $\mu$ L DNA tổng số (30 ng), 1  $\mu$ L mồi xuôi P42F (10 pmol/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L mồi ngược P42R (10 pmol/ $\mu$ L), 5  $\mu$ L đệm PCR 10X, 1  $\mu$ L dNTP (10 pmol/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L enzyme VELOCITY DNA polymerase (5 U/ $\mu$ L), nước cất vô trùng vừa đủ 50  $\mu$ L. PCR được thực hiện với chu trình luân nhiệt như sau: tiền biến tính 95°C/5 phút; tiếp đến là 30 chu kỳ: 95°C/30 giây, 50°C/30 giây và 72°C/60 giây; cuối cùng là 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di agarose gel 1% với thuốc nhuộm ethidium bromide (0,5  $\mu$ g/l).

### 2.3.2. Tạo dòng gen mã hóa kháng nguyên P42

Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch bằng EZ-10 spin column DNA gel extraction miniprep kit (Biobasic) được gắn vào vector pET200/D-TOPO với thành phần phản ứng gắn bao gồm 2  $\mu$ L sản phẩm PCR sau tinh sạch (20 ng), 1  $\mu$ L vector pET200/D-TOPO (20 ng/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L dung dịch muối, nước cất vô trùng để đạt thể tích gắn là 6  $\mu$ L. Trộn nhẹ và ủ ở 25°C trong 60 phút; sản phẩm phản ứng gắn được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* BL21 (DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt. Các dòng tế bào mang vector tái tổ hợp được chọn lọc bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu P42 và cặp mồi T7 (T7F: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' và T7R: 5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3') được thiết kế sẵn trên vector pET200/D-TOPO.

Vector tái tổ hợp pET200/P42 được tách bằng Isolate II plasmid mini kit, Bio 52056 (Bioline) và gửi đi giải trình tự nucleotide tại Công ty 1<sup>st</sup>BASE (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.

### 2.3.3. Biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên P42 trong *E. coli* BL21 (DE3)

Các tế bào *E. coli* BL21 (DE3) có chứa vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên P42 được nuôi trong 50 mL môi trường YJ có bổ sung 100  $\mu$ g/mL kanamycin ở 37°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Khi mật độ tế bào đạt OD<sub>600</sub> = 0,8 thì bổ sung 40  $\mu$ L chất cảm ứng IPTG 1M (Bio-Rad) để đạt nồng độ 0,8 mM và tiếp tục nuôi ở 30°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 6.000 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; 0,001 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 8 M, 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-P42 được tinh sạch từ protein tổng số bằng ProBond™ purification system kit (Thermo Fisher Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Sự biểu hiện protein của đoạn gen mã hóa kháng nguyên P42 trong *E. coli* BL21 (DE3) được đánh giá bằng phương pháp điện di SDS-PAGE.

### 2.3.4. Kiểm tra tính đặc hiệu của kháng nguyên tái tổ hợp P42

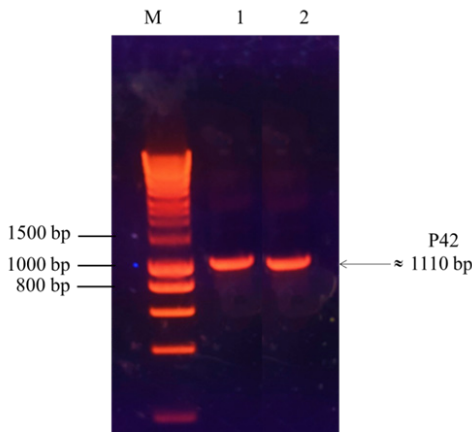
Tính đặc hiệu của kháng nguyên tái tổ hợp P42 được xác định bằng phản ứng ELISA gián tiếp giữa huyết thanh lợn với kháng nguyên phủ đĩa là kháng nguyên tái tổ hợp P42 (đã được tinh

sạch theo phương pháp được nêu ở trên). Có tất cả 6 mẫu huyết thanh của hai nhóm lợn được thu thập: 3 mẫu huyết thanh của lợn không bị nhiễm *M. hyopneumoniae*, 3 mẫu huyết thanh của lợn bị nhiễm *M. hyopneumoniae*. Hai nhóm lợn này được xác định dựa vào các triệu chứng lâm sàng và bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu 16S rRNA của *M. hyopneumoniae* [8].

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả phân lập đoạn gen mã hóa kháng nguyên P42 của *M. hyopneumoniae*

Sau khi tách DNA 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 kháng nguyên P42. Kết quả điện di sản phẩm (hình 1) cho thấy các băng DNA được khuếch đại có kích thước khoảng 1.110 bp. Sản phẩm PCR cho một băng duy nhất, sáng và rõ nét.



**Hình 1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu cho đoạn gen mã hóa kháng nguyên P42**

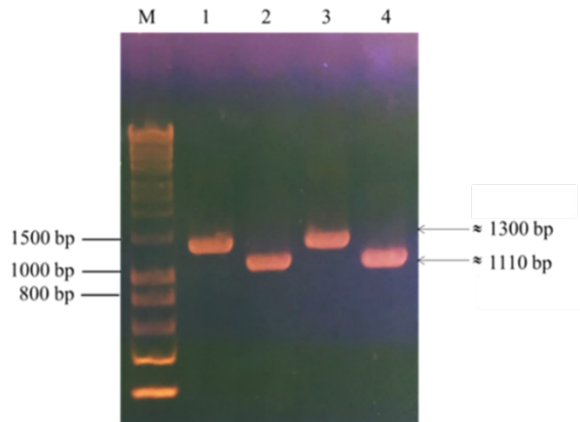
M: Marker HyperLadder™ 1kb (Bioline), 1 và 2: Sản phẩm PCR gen mã hóa kháng nguyên P42 phân lập từ các mẫu DNA khác nhau

#### 3.2. Kết quả tạo dòng gen mã hóa kháng nguyên P42 của *M. hyopneumoniae*

Sản phẩm PCR được tinh sạch từ gel agarose 1% và được gắn vào vector pET200/D-TOPO. Tiến hành biến nạp sản phẩm gắn chứa plasmid pET200/P42 vào tế bào *E. coli* BL21, chọn lọc

trên môi trường LB agar có bổ sung ampicillin. Sự hiện diện của đoạn gen mã hóa kháng nguyên P42 trong tế bào *E. coli* BL21 được kiểm tra bằng phản ứng PCR trực tiếp với cặp mồi đặc hiệu cho đoạn gen mã hóa kháng nguyên P42 và cặp mồi T7 của vector pET200/D-TOPO.

Kết quả điện di sản phẩm PCR ở hình 2 cho thấy xuất hiện băng DNA tương tự với kích thước phân lập ban đầu (khoảng 1.110 bp) đối với cặp mồi đặc hiệu và băng DNA có kích thước khoảng 1.300 bp đối với cặp mồi T7 (bao gồm kích thước của gen và một đoạn khoảng 200 bp nằm trên vector pET200/D-TOPO do cặp mồi T7 khuếch đại). Điều này chứng tỏ đoạn gen mã hóa kháng nguyên P42 đã được tạo dòng thành công vào vector pET200/D-TOPO trong tế bào *E. coli* BL21.



**Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định sự có mặt của plasmid tái tổ hợp pET200/P42 trong tế bào *E. coli* BL21**

M: Marker HyperLadder™ 1kb (Bioline); 1, 3: Sản phẩm PCR với cặp mồi T7; 2, 4: Sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu cho đoạn gen mã hóa kháng nguyên P42

Kết quả giải trình tự cho thấy đoạn gen mã hóa kháng nguyên P42 phân lập được có độ dài 1.119 bp, có độ tương đồng cao (99%) với trình tự gen *mhp0067* của *M. hyopneumoniae* 7448, mã số AE017244.1 (từ vị trí nucleotide thứ 88523 đến 89641), chỉ sai khác ở 3 vị trí (nucleotide thứ 339, 393 và 936) (hình 3). Tuy nhiên, sự sai khác của nucleotide thứ 339, 393

P42 AE017244.1	1 88523	ATGGCGCTTACAAGACTTAAAGAAGAGGCTGAAAAAACCCAAAATTAATCTTTCAAATCAA ATGGCGCTTACAAGACTTAAAGAAGAGGCTGAAAAAACCCAAAATTAATCTTTCAAATCAA	60 88582
P42 AE017244.1	61 88583	AGTGTTCCTACAGTTTCTTACCATTTTATAGGAATGGGCAAAAACGGGCCGATTAAACGTT AGTGTTCCTACAGTTTCTTACCATTTTATAGGAATGGGCAAAAACGGGCCGATTAAACGTT	120 88642
P42 AE017244.1	121 88643	GAACCTGAACTTAAAAGATCAGAATTTGAAAAATGACTGCCCATTTAATCGATAGAACT GAACCTGAACTTAAAAGATCAGAATTTGAAAAATGACTGCCCATTTAATCGATAGAACT	180 88702
P42 AE017244.1	181 88703	CGCAAACCAATTGTTGATGCTCTAAAACAAGCAAAAATTGAGGCTTCAGATCTTGTATGAA CGCAAACCAATTGTTGATGCTCTAAAACAAGCAAAAATTGAGGCTTCAGATCTTGTATGAA	240 88762
P42 AE017244.1	241 88763	GTTCTCCTGTAGGTGGATCAACAAGAATGCCAGCTGTTCAAGTCAATGATTGAGCATACT GTTCTCCTGTAGGTGGATCAACAAGAATGCCAGCTGTTCAAGTCAATGATTGAGCATACT	300 88822
P42 AE017244.1	301 88823	TTAAATAAAAAGCCAAATCGTTCAATTAATCCTGATGAGGTAGTCGCAATTTGGTCTGCA TTAAATAAAAAGCCAAATCGTTCAATTAATCCTGATGAGGTAGTCGCAATTTGGTCTGCA	360 88882
P42 AE017244.1	361 88883	ATTCAAGGGGGGTTCTAGCTGGAGAGATCAGTGTCTACTTTTATAGTTACTCTCT ATTCAAGGGGGGTTCTAGCTGGAGAGATCAGTGTCTACTTTTATAGTTACTCTCT	420 88942
P42 AE017244.1	421 88943	TTAACTTTAGGAATTGAAACTTTAGGTGGAATTGCAACACCTTTGATTCCAAGAAATACA TTAACTTTAGGAATTGAAACTTTAGGTGGAATTGCAACACCTTTGATTCCAAGAAATACA	480 89002
P42 AE017244.1	481 89003	ACAATTCGGTAAACAAAATCACAATTTTCTCAACAGCTGAGGATAATCAAACCGAAGTA ACAATTCGGTAAACAAAATCACAATTTTCTCAACAGCTGAGGATAATCAAACCGAAGTA	540 89062
P42 AE017244.1	541 89063	ACAATTTCTGTTGTCGAAGGTGAACGTCACACTGCAGCGGATAATAAAATGTTAGGTGCG ACAATTTCTGTTGTCGAAGGTGAACGTCACACTGCAGCGGATAATAAAATGTTAGGTGCG	600 89122
P42 AE017244.1	601 89123	TTTAAATTTATCAGGAATTGAAGCTGCTCCACGAGGCTTCCCAGATTGAAGTTAGTTTT TTTAAATTTATCAGGAATTGAAGCTGCTCCACGAGGCTTCCCAGATTGAAGTTAGTTTT	660 89182
P42 AE017244.1	661 89183	TCAATTGATGTCAACGGGATTACAACGGTTTCAGCAAAAAGATAaaaaaCCGGCAAAGAA TCAATTGATGTCAACGGGATTACAACGGTTTCAGCAAAAAGATAAAAAAACCGCAAAGAA	720 89242
P42 AE017244.1	721 89243	CAAACAATTACAATTAATAACTTCAACTTTATCAGAAGAGAAATTAATAAGATGATT CAAACAATTACAATTAATAACTTCAACTTTATCAGAAGAGAAATTAATAAGATGATT	780 89302
P42 AE017244.1	781 89303	CAGGAAGCCGAAGAAAATCGTGAAGCTGATGCTCTTAAAAAAGACAAAATCGAGACAACA CAGGAAGCCGAAGAAAATCGTGAAGCTGATGCTCTTAAAAAAGACAAAATCGAGACAACA	840 89362
P42 AE017244.1	841 89363	GTTCTGCGCAAGGGCTTATTAATCAACTTGAGAAATCAATAACTGATCAAGGTGAAAAA GTTCTGCGCAAGGGCTTATTAATCAACTTGAGAAATCAATAACTGATCAAGGTGAAAAA	900 89422
P42 AE017244.1	901 89423	ATTGATCCAAAACAAAAGAATTACTTGAAAAACAGATTCAGAAATTAAGAATCTTCTTA ATTGATCCAAAACAAAAGAATTACTTGAAAAACAAATTCAGAAATTAAGAATCTTCTTA	960 89482
P42 AE017244.1	961 89483	AAAGAAGAAAAAAGTACGCAATTAATAATTAATAATAGACCAAAATGAAGCAGCTGCCCAA AAAGAAGAAAAAAGTACGCAATTAATAATTAATAATAGACCAAAATGAAGCAGCTGCCCAA	1020 89542
P42 AE017244.1	1021 89543	TCTTTTGGCAGGCAACCGCGCAGCAAGCAATACATCTGAATCTGATCCAAAAGCTGAT TCTTTTGGCAGGCAACCGCGCAGCAAGCAATACATCTGAATCTGATCCAAAAGCTGAT	1080 89602
P42 AE017244.1	1081 89603	GATTCAAACACAATTGATGCTGAAATCAAGCAGGATTAA 1119 GATTCAAACACAATTGATGCTGAAATCAAGCAGGATTAA 89641	

**Hình 3. Kết quả so sánh trình tự nucleotide đoạn gen mã hóa kháng nguyên P42 với trình tự gen mhp0067 của *M. hypopneumoniae* 7448 (AE017244.1)**

P42 AAZ53444.1	1 229	MALTRLKKEEAETKINLSNQSVSTVSLPFLGMGKNGPINVELELRSEFEKMTAHLIDRT MALTRLKKEEAETKINLSNQSVSTVSLPFLGMGKNGPINVELELRSEFEKMTAHLIDRT	60 288
P42 AAZ53444.1	61 289	RKPIVDALKQAKIEASDLDEVLLVGGSTRMPAVQSMIEHTLNKKPNRSINPDEVVAIGAA RKPIVDALKQAKIEASDLDEVLLVGGSTRMPAVQSMIEHTLNKKPNRSINPDEVVAIGAA	120 348
P42 AAZ53444.1	121 349	IQQGVLAGIEISDVLLDVTPLTLGIETLGGIATPLIPRNTTIPVTKSQIFSTAEDNQTEV IQQGVLAGIEISDVLLDVTPLTLGIETLGGIATPLIPRNTTIPVTKSQIFSTAEDNQTEV	180 408
P42 AAZ53444.1	181 409	TISVVQGERQLAADNKMLGRFNLSGIEAAPRGLPQIEVSFSDVNGIITVSAKDKKTGKE TISVVQGERQLAADNKMLGRFNLSGIEAAPRGLPQIEVSFSDVNGIITVSAKDKKTGKE	240 468
P42 AAZ53444.1	241 469	QTITIKNTSTLSEEEINKMIQEAEENREADALKKDKIETTVAEGLINQLEKSITDQGEK QTITIKNTSTLSEEEINKMIQEAEENREADALKKDKIETTVAEGLINQLEKSITDQGEK	300 528
P42 AAZ53444.1	301 529	IDPKQKELLEKQIQELKDLLKEEKTDELKLLDQIEAAQSFQAQATAQQANTSESDPKAD IDPKQKELLEKQIQELKDLLKEEKTDELKLLDQIEAAQSFQAQATAQQANTSESDPKAD	360 588
P42 AAZ53444.1	361 589	DSNTIDAEIKQD 372 DSNTIDAEIKQD 600	

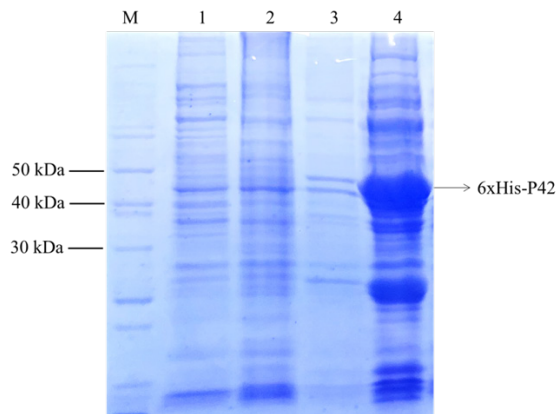
**Hình 4. Kết quả so sánh trình tự amino acid suy diễn từ đoạn gen mã hóa kháng nguyên P42 với trình tự amino acid của *M. hypopneumoniae* 7448 (AAZ53444.1)**



và 936 không làm ảnh hưởng đến quá trình biểu hiện protein vì trình tự amino acid suy diễn của kháng nguyên P42 thu được có độ tương đồng 100% với protein tương ứng của *M. hyopneumoniae* 7448, mã số AAZ53444.1 (từ vị trí amino acid thứ 229 đến 600) (hình 4).

### 3.3. Kết quả biểu hiện đoạn gen mã hóa kháng nguyên P42

Sự biểu hiện protein P42 tái tổ hợp ở *E. coli* BL21 (DE3) trong môi trường YJ được thể hiện trên gel polyacrylamide 15% có chứa SDS (hình 5).

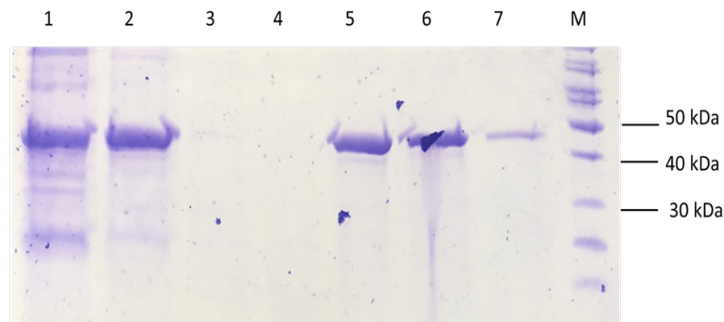


**Hình 5. Điện di SDS-PAGE đánh giá khả năng biểu hiện protein tái tổ hợp P42 trong *E. coli* BL21 (DE3)**

M: Marker 10-200 kDa (Bio basic), 1: Mẫu

protein hòa tan thu được từ tế bào *E. coli* mang vector tái tổ hợp pET200/P42 không cảm ứng IPTG, 2: Mẫu protein thể vùi thu được từ tế bào *E. coli* mang vector tái tổ hợp pET200/P42 không cảm ứng IPTG, 3: Mẫu protein hòa tan thu được từ tế bào *E. coli* mang vector tái tổ hợp pET200/P42 được cảm ứng bằng IPTG, 4: Mẫu protein thể vùi thu được từ tế bào *E. coli* mang vector tái tổ hợp pET200/P42 được cảm ứng bằng IPTG

Theo tính toán, protein P42 tái tổ hợp được biểu hiện sẽ có khối lượng khoảng 43,8 kDa gồm protein P42 có khối lượng phân tử khoảng 40,6 kDa và đuôi dung hợp của vector pET200/D-TOPO có khối lượng phân tử khoảng 3,2 kDa. Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy protein P42 tái tổ hợp không có mặt trong protein dịch thể, mà nằm trong protein thể vùi có khối lượng khoảng 45 kDa, phù hợp với kích thước đã được ước tính. Như vậy, protein P42 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 ProBond™ purification system kit (Thermo Fisher Scientific), thu được một băng protein duy nhất có khối lượng khoảng 45 kDa (hình 6). Kết quả này hoàn toàn tương tự với kết quả trong nghiên cứu của Simionatto và cs. [12].

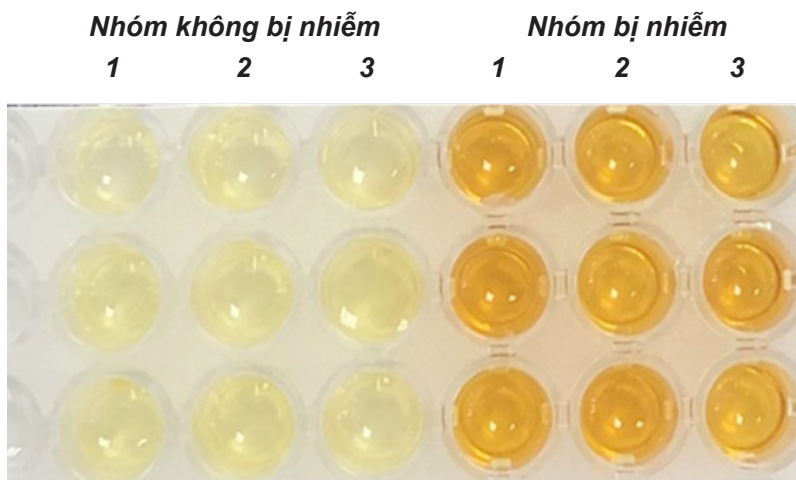


**Hình 6. Kết quả tinh sạch protein tái tổ hợp 6xHis-P42 từ thể vùi**

M: Marker 10-200 kDa (Bio basic); 1: Dịch thu được sau khi cho dịch protein tái tổ hợp chảy qua gel; 2: Dịch thu được sau khi rửa gel với Denaturing Binding Buffer; 3, 4: Dịch thu được sau khi rửa gel với Denaturing Wash Buffer; 5, 6, 7: Dịch thu được sau khi rửa gel với Denaturing Elution Buffer.

### 3.4. Kết quả kiểm tra tính đặc hiệu của protein tái tổ hợp P42

Kết quả kiểm tra tính đặc hiệu của protein tái tổ hợp P42 bằng phương pháp ELISA gián tiếp được trình bày ở hình 7 và bảng 1.



Hình 7. Kết quả ELISA kiểm tra tính đặc hiệu của kháng nguyên tái tổ hợp P42

Bảng 1. Kết quả kiểm tra tính đặc hiệu của kháng nguyên tái tổ hợp P42

Nhóm	Mẫu huyết thanh	Giá trị OD <sub>450</sub>	Trung bình
Không bị nhiễm	1	0,172	0,185
	2	0,198	
	3	0,184	
Bị nhiễm	1	1,475	1,432
	2	1,454	
	3	1,368	
Đối chứng (không huyết thanh)			0,064

Kết quả ở bảng 1 cho thấy giá trị OD<sub>450</sub> trung bình ở các giếng được phủ kháng nguyên tái tổ hợp P42 của nhóm bị nhiễm *M. hyopneumoniae* là 1,432; ở các giếng được phủ kháng nguyên tái tổ hợp P42 của nhóm không bị nhiễm *M. hyopneumoniae* là 0,185; ở giếng đối chứng là 0,064. Điều này chứng tỏ kháng nguyên tái tổ hợp P42 có liên kết với kháng thể có trong huyết thanh lợn đã nhiễm *M. hyopneumoniae*.

## IV. KẾT LUẬN

Đoạn gen mã hóa kháng nguyên P42 của *M. hyopneumoniae* đã được tạo dòng và biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3). Đoạn gen này có kích thước 1.119 bp và mã hóa tạo chuỗi polypeptide dài 372 amino acid, có độ tương đồng 100% so với trình tự công bố trên GenBank (mã số AAZ53444.1). Thí nghiệm tinh sạch và điện di SDS-PAGE cho thấy protein tái tổ hợp

6xHis-P42 có khối lượng phân tử khoảng 44 kDa. Protein tái tổ hợp 6xHis-P42 có kết hợp đặc hiệu với kháng thể trong huyết thanh của lợn nhiễm *M. hyopneumoniae*.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Bá Hiên, 2011. *Giáo trình Bệnh truyền nhiễm thú y*. NXB Nông nghiệp, tr.252.
2. Phạm Sĩ Lăng và Trương Văn Dung, 2002. *Một số bệnh mới do vi khuẩn và Mycoplasma ở gia súc - gia cầm nhập nội và biện pháp phòng trị*. NXB Nông nghiệp.
3. Assao V.S., Scatamburlo T.M., Araujo E.N., Santos M.R., Pereira C.E.R., Guedes R.M.C., Bressan G.C., Fietto J.L.R., Chang Y.-F. & Moreira M.A.S., 2019. Genetic variation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from Brazilian field samples. *BMC microbiology*, 19(1), 234.
4. Chen Y.L., Wang S.N., Yang W.J., Chen Y.J., Lin H.H. & Shiuan D., 2003. Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. *Infection and immunity*, 71(3), 1155-1160.
5. Chou S.Y., Chung T.L., Chen R.J., Ro L.H., Tsui P.I. & Shiuan D., 1997. Molecular cloning and analysis of a HSP (heat shock protein) like 42 kDa antigen gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *IUBMB Life*, 41(4), 821-831.
6. Galli V., Simionatto S., Marchioro S., Fisch A., Gomes C., Conceição F. & Dellagostin O., 2012. Immunisation of mice with *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens P37, P42, P46 and P95 delivered as recombinant subunit or DNA vaccines. *Vaccine*, 31(1), 135-140.
7. Maes D., Segales J., Meyns T., Sibila M., Pieters M. & Haesebrouck F., 2008. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Veterinary microbiology*, 126(4), 297-309.
8. Mattsson J.G., Bergström K., Wallgren P. & Johansson K.E., 1995. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by *in vitro* amplification of the 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(4), 893-897.
9. Meens J., Selke M. & Gerlach G.F., 2006. Identification and immunological characterization of conserved *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoproteins Mhp378 and Mhp651. *Veterinary microbiology*, 116(1-3), 85-95.
10. Sibila M., Pieters M., Molitor T., Maes D., Haesebrouck F. & Segalés J., 2009. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *The Veterinary Journal*, 181(3), 221-231.
11. 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), 209-216.
12. 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), 132-136.

Ngày nhận 1-6-2021

Ngày phản biện 15-6-2021

Ngày đăng 1-12-2021