

- Plumb, J. A., Vinitnantharat, S., Paterson, W. D., Salenius, K., A.F.S.F.H.S.**, 1995. Prevention of enteric septicemia in catfish by vaccination. *Diseases in Asia Aquaculture*, 2: 399 - 404.
- Reed, L.J., & H. Muench**, 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Journal of Epidemiology*, 27 (3): 493 - 497.
- Shoemaker C, Klesius P, Bricker J**, 1999. Efficacy of a modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccine in channel catfish as young as seven days post hatch. *Aquaculture* 176(3):189 - 193.
- Thune, R.L., Fernandez, D.H., & Battista, J.R.**, 1999. An *aroA* Mutant of *Edwardsiella ictaluri* Is Safe and Efficacious as a Live, Attenuated Vaccine. *Journal of Aquatic Animal Health* 11(4):358–372.
- Waltman, W.D., Shotts, E.B., & Hsu, T.C.**, 1986. Biochemical characteristics of *Edwardsiella ictaluri*. *Applied and environmental microbiology*, 51(1): 101 - 4.
- Yuasa, K., Kholidin, E.B., Panigoro, N., & Hatai, K.**, 2003. First Isolation of *Edwardsiella ictaluri* from Cultured Striped Catfish *Pangasius hypophthalmus* in Indonesia. *Fish Pathology*, 38 (4): 181-183.

***Edwardsiella ictaluri* wzz mutant as a potential vaccine for preventing bacillary necrosis on catfish (*Pangasionodon hypophthalmus*)**

Bui Thi Thanh Tinh, Tran Hanh Triet, Tran Van Huong,
Vu Thi Thanh Huong, Duong Hoa Xo, Nguyen Quoc Binh

Abstract

Bacillary necrosis on catfish (*P. phthalmus*) infected by *Edwardsiella ictaluri* causes major economic losses because of high mortality rates (60 - 80 %) and occur at high frequency. Vaccination is an urgent issue as use of antibiotic leads to drug resistance and hinders export. However, the type of the vaccine as well as the mode of vaccination, stage of fish development to vaccinate is the problems to resolve. Biotechnology Center of Ho Chi Minh conducted studies on live attenuated *Edwardsiella ictaluri* strains against bacillary necrosis and found the *Edwardsiella ictaluri* wzz mutant (O-antigen chain length determinant gene) was created by knockout gene method which gave the best results. Laboratory-scale experiments showed that this strain was safe and had efficacious in Tra catfish by one time immersion at fried stage and 2.5-month-old Tra catfish with relative percent survival were 30% and 65%, respectively, while it was 95% for the twice immersion fish at fried stage and 2.5-month-old Tra catfish. This is an attenuated *Edwardsiella ictaluri* strains have potentials used as immersion vaccine for Tra catfish.

Keywords: *Edwardsiella ictaluri*, modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccine, Tra catfish (*Pangasionodon hypophthalmus*), Bacillary necrosis

Ngày nhận bài: 2/6/2018
Ngày phản biện: 20/6/2018

Người phản biện: PGS.TS. Phạm Minh Đức
Ngày duyệt đăng: 16/7/2018

TẠO CHỦNG *VIBRIO HARVEYI* ĐỘT BIẾN GEN WZZ CÓ KHẢ NĂNG BIỂU HIỆN PROTEIN VỎ VP28 CỦA VI RÚT GÂY BỆNH ĐỐM TRẮNG WSSV (WHITE SPOT SYNDROME VIRUS) TRÊN TÔM

Mai Thu Thảo¹, Trần Phạm Vũ Linh¹, Ngô Huỳnh Phương Thảo¹,
Lâm Võ Nguyên¹, Nguyễn Quốc Bình¹

TÓM TẮT

Trên thế giới đã có nhiều cách tiếp cận để phát triển các chế phẩm ngăn ngừa bệnh đốm trắng ở tôm. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả tiếp cận bằng cách gây đột biến gen trên chủng *Vibrio harveyi* gây bệnh phát sáng trên tôm và biểu hiện protein vỏ VP28 của vi rút gây bệnh đốm trắng trên chủng này. Cassette HKT_{wzz} (ΔHKT_{wzz}) gồm trình tự H_{wzz} (phần đầu gen wzz); K (trình tự gen kháng Kanamycin), T_{wzz} (phần cuối gen wzz) được tạo ra bằng PCR overlap. Sau đó, trình tự Ptac-VP28 được chèn vào ΔHKT_{wzz} nhờ vào vị trí enzyme *NdeI* nằm trên cassette. ΔHKT_{wzz} có gắn Ptac-VP28 được chèn vào pGP704 và tạo dòng trong *E. coli* SM10λpir. Chủng đột biến được tạo ra bằng phương pháp tiếp hợp giữa chủng cho là *E. coli* SM10λpir::pGP704::ΔHKT_{wzz}::Ptac-VP28 và chủng nhận *Vibrio harveyi* hoang dại BL1 (được thu nhận từ ao tôm bệnh ở Bạc Liêu) dựa trên cơ chế tái tổ hợp tương đồng trên vùng trình tự H_{wzz} và T_{wzz}. Các kết quả kiểm tra biểu hiện bằng phương pháp SDS-PAGE và Western Blot cho thấy chủng đột biến có khả năng biểu hiện protein vỏ VP28.

Từ khóa: Knock-out gen, pGP704, SM10λpir, tiếp hợp, tái tổ hợp tương đồng

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh đốm trắng luôn là dịch bệnh nguy hiểm nhất đối với ngành nuôi tôm. Một khi đã mắc bệnh, tôm có thể chết cả ao trong vòng 3 - 10 ngày. Nghiên cứu vắc xin cho tôm đang đặt ra thách thức đối với các nhà khoa học. Đối với tôm không thể gây đáp ứng miễn dịch 1 lần và đòi hỏi bộ nhớ miễn dịch duy trì lâu dài để bảo vệ tôm khỏi các kháng nguyên xâm nhập (Rowley and Powell, 2007). VP28 là protein cấu trúc của WSSV và cũng là protein quan trọng nhất cho cơ chế xâm nhiễm vào tế bào của WSSV. Protein dung hợp VP28-EGFP có khả năng bám vào tế bào tôm ở pH=6 trong vòng 0,5 h. Nhóm nghiên cứu đã tìm thấy VP28-EGFP có mặt trong tế bào chất. Điều này có thể giải thích VP28 đã xâm nhập vào tế bào tôm bằng cơ chế nhập bào (endocytosis) với cấu trúc protein bám vào tế bào tôm tương tự như trên màng tế bào WSSV (Qi Y *et al.*, 2004). Ở vi khuẩn, chiều dài chuỗi O-antigen được điều hòa bởi gen *wzz*, còn được gọi là *Cld* [chain length determinant] hay *Rol* [regulator of O-antigen length]. Khi chủng vi khuẩn bị đột biến gen *wzz* thì chiều dài chuỗi O-antigen sẽ phân bố một cách ngẫu nhiên (Franco *et al.*, 1998; Najdenski *et al.*, 2003). Từ đó, chủng đột biến sẽ bị giảm tính độc hoặc mất đi tính độc do chuỗi O-antigen gây ra. Nghiên cứu này đã sử dụng *Vibrio harveyi*, là một vi khuẩn gây bệnh phát sáng trên tôm (Liu *et al.*, 1996) được gây đột biến bằng

phương pháp loại bỏ một phần gen *wzz* và biểu hiện protein vỏ VP28 trong chủng này với mục tiêu sử dụng chủng này như một vật mang protein vỏ VP28 vào trong cơ thể tôm.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng hoang dại *Vibrio harveyi* BL1 được phân lập từ ao nuôi tôm tại tỉnh Bạc Liêu; các chủng *E. coli* SM10 λpir, *E. coli* BL21 được cung cấp bởi Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. HCM; các véc tơ tạo dòng: pJET 1.2/blunt, pKD4, pGP704; môi trường TCBS (Thiosulfate - Citrate Bile - Sucrose), VHA (*Vibrio harveyi* agar) để phân lập *V. harveyi*; hóa chất sinh học phân tử: primer, master mix PCR, enzyme cắt giới hạn *NedI*, enzyme bất hoạt đầu 3'-P.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và định danh vi khuẩn

Đĩa TCBS phân lập *Vibrio* spp. được thu nhận tại Chi cục nuôi trồng Thủy Sản tỉnh Bạc Liêu. Khi đem về Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh, tiến hành phân lập trên môi trường VHA (Harris *et al.*, 1996), môi trường dùng để định danh *V. harveyi* và tiến hành phản ứng PCR với cặp mồi F-*luxN*, R-*luxN* (Hernandez and Olmos, 2004) đặc hiệu cho *V. harveyi* khuếch đại vùng trình tự dài 2048 bp trên gen *luxN* của *V. harveyi* (Bảng 1).

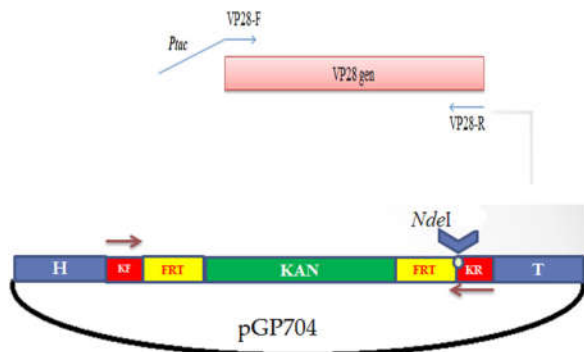
Bảng 1. Danh sách các cặp mồi sử dụng trong quá trình tạo cassette HKT *wzz*

STT	Tên mồi	Gen	Trình tự
1	F- <i>luxN</i>	<i>luxN</i>	5'- CTGTGTACTCACTGTTTATC-3'
	R- <i>luxN</i>		5'- GTCTAATTCGCGTTCTCCA -3'
2	KF	<i>Kanamycin</i>	5'- GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'
	KR		5'- GACATGGGAATTAGCCATGGTCC -3'
3	WF1	<i>Hwzz</i>	5'- ACGGTCAGATGCCAATAGCTCCTG-3'
	WR1		5'-GAAGCAGCTCCAGCCTACACAGACGAAAAGCT-GTTCAGCGAAGC -3'
4	WF2	<i>Twzz</i>	5'- GGACCATGGCTAATTCCCATGTCGGGACTTGATTC-GTAGGGGC-3'
	WR2		5'- GTGGCAATCAATAGCTTCCGCCT-3'
5	Fi-K	Vùng trình tự 435 bp bên trong gen <i>kanamycin</i>	5'- CTGGACGAAGAGCATCAGGG -3'
	Ri-K		5'- CGGAAAACGATTCCGAAGCC -3'
6	Fo- <i>wzz</i>	Vùng trình tự 2384 bp bên ngoài gen <i>wzz</i>	5'-TTACCGAAAGCAGAGGTGGG-3'
	Ro- <i>wzz</i>		5'-TCCTGATCACTTCAGACGGC-3'
7	VP28-F	VP28	5'-ATGGATCTTTCTTTCACTCTTTTCGG-3
	VP28-R		5'-TTACTCGGTCTCAGTGCCAGAG-3'

2.2.2. Tạo chủng *E.coli* SM10λpir mang plasmid pGP704 có chèn cassette HKT_{wzz} gắn vùng trình tự Ptac-VP28 (ΔHKT_{wzz}::Ptac-VP28)

Đoạn đầu H_{wzz} và đoạn cuối T_{wzz} được khuếch đại từ bộ gen chủng *V. harveyi* với các cặp mỗi WF1+WR1 và WF2+WR2; gen Kanamycin (K) được khuếch đại từ plasmid pKD4 bằng cặp mỗi KF+KR (Bảng 1).

Ba đoạn gen được tiến hành PCR overlap để tạo trình tự HKT_{wzz}. Cassette HKT_{wzz} được chèn vào trong véc tơ pGP704 (trường Đại học Harvard) và tạo dòng trong *E.coli* DH5αλpir (Biomedal). Trình tự Ptac-VP28 được gắn vào vector pAmCyanN1-1 đã được kiểm tra biểu hiện tốt trong *E.coli* BL21. Tiến hành cắt mở vòng pGP704::HKT_{wzz} tại vị trí NdeI để gắn trình tự Ptac-VP28 vào véc tơ tái tổ hợp tại vị trí này. Véc tơ tái tổ hợp pGP704::HKT_{wzz}::Ptac-VP28 được tạo dòng trong *E.coli* SM10λpir (Biomedal). ΔHKT_{wzz}::Ptac-VP28 được sử dụng để gây đột biến gen *wzz* và có gen kháng kanamycin là chỉ thị để chọn lọc dòng đột biến (Hình 1).



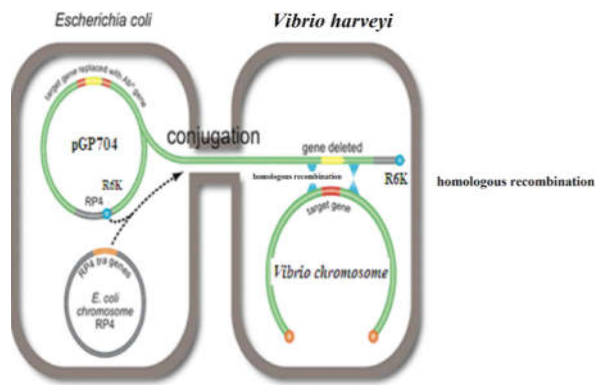
Hình 1. Sơ đồ vị trí cắt NdeI trên Δ HKT_{wzz} để chèn Ptac-VP28

2.2.3. Tiếp hợp

SM10λpir chứa cassette được sử dụng làm chủng cho vì nó có yếu tố chuyển RP4 nằm trên nhiễm sắc thể và chứa gen *pir* mã hóa cho protein π cho phép các véc tơ pGP704 mang điểm khởi đầu sao chép

oriR6K nhân lên; đồng thời pGP704 cũng mang yếu tố di động mob nên có thể sát nhập vào nhiễm sắc thể SM10 λpir và di chuyển vào trong chủng nhận là *Vibrio harveyi* (Thune *et al.*, 2011).

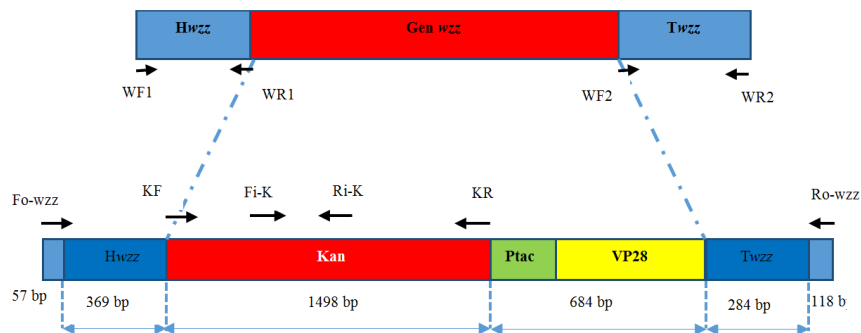
Trộn 2 chủng *E. coli* SM10λpir và *V. harveyi* theo tỷ lệ 1 : 1 và ủ qua đêm ở 28°C để diễn ra quá trình tái tổ hợp tương đồng. Sau quá trình tiếp hợp véc tơ pGP704 mang cassette đi vào trong bộ gen chủng nhận nhưng không thể nhân lên vì thiếu gen *pir*, ΔHKT_{wzz}::Ptac-VP28 có thể sát nhập vào bộ gen nhiễm sắc thể bằng tái tổ hợp tương đồng nhờ sự trao đổi chéo giữa 2 vùng trình tự tương đồng trên véc tơ và gen tương ứng trên nhiễm sắc thể. Quá trình chọn lọc chủng đột biến trên môi trường LB có chứa kháng sinh kanamycin và colistin. Vì véc tơ pGP704 không tự nhân lên được trong chủng nhận *V. harveyi* nên các khuẩn lạc *V. harveyi* mọc trên môi trường có chứa kháng sinh được nghi ngờ là các dòng vi khuẩn đột biến gen (Hình 2). Chủng đột biến được ký hiệu VH-Wz_M::Ptac-VP28.



Hình 2. Sơ đồ trao đổi chéo giữa 2 vùng trình tự tương đồng trong quá trình tiếp hợp giữa *E. coli* và *V. harveyi*

2.2.4. Ki2.4. -Wz_M::Ptac-VP28.

Vùng trình tự bị loại bỏ của gen *wzz* dài 1521 bp thay vào đó là trình tự gen kháng Kanamycin và Ptac-VP28 dài 2200 bp. Tiến hành kiểm tra trước và sau đột biến bằng PCR với các cặp mỗi sau theo như sơ đồ (Hình 3).



Hình 3. Sơ đồ các cặp mỗi kiểm tra chủng đột biến

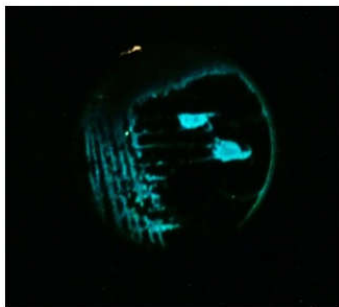
- Fo-wzz + Ri-K và Ro-wzz + Fi-K: trình tự mỗi Fo-wzz nằm trên genome của *V. harveyi*, nằm ngoài mỗi WF1, trình tự mỗi Ro-wzz nằm trên genome của *V. harveyi*, nằm ngoài mỗi WR2. Chạy kết hợp 2 cặp mỗi này cho phép xác định cassette có được chèn thẳng trực tiếp vào trong bộ gen của *V. harveyi* hay không.

- Fi-wzz + Ri-wzz: khuếch đại vùng trình tự nằm bên trong gen wzz từ vị trí 460070 đến vị trí 460365. Vùng này sẽ bị loại bỏ trong quá trình gây đột biến.

- KF + KR: phát hiện vùng trình tự gen kháng kanamycin trong chủng đột biến, có kích thước là 1498 bp.

2.2.5. Biểu hiện protein vỏ VP28 trong chủng đột biến

Chủng đột biến được lên men ở 28°C cho đến khi đạt được OD=1. Thu nhận sinh khối và huyền phù cặn trong dung dịch đệm (100 mM NaCl, 25 mM Tris HCl, pH=8). Tiến hành phá màng tế bào bằng sóng siêu âm. Ly tâm để loại bỏ xác tế bào và thu nhận dịch protein tổng số. Sau đó, tiến hành tủa protein tổng bằng TCA 20%, ủ đá lạnh trong 10 phút, rửa cặn 3 lần với acetone lạnh. Sau đó, tiến hành hòa tan cặn trong nước. Tiến hành phân tích SDS-PAGE và WESTERN BLOT bằng kháng thể thô đa dòng đặc hiệu kháng VP28 được cung cấp bởi Trung tâm Công nghệ Sinh học.



Hình 4. Đĩa khuẩn lạc *V. harveyi* phát sáng sau 18 giờ

3.1.2. Tạo chủng *E.coli* SM10 λ pir mang plasmid pGP704 có chèn cassette HKTwzz gắn vùng trình tự Ptac-VP28 (Δ HKTwzz::Ptac-VP28)

Ở lần PCR thứ 1, khuếch đại trình tự các đoạn H-wzz (346 bp), T-wzz (303 bp) và gen kháng Kanamycin (1498 bp). Kết quả điện di trên gel agarose cho ra kết quả đúng với lý thuyết (Hình 6). Ở lần PCR thứ 2 khi trộn các đoạn H-wzz, R-wzz, Kan theo tỉ lệ 0,1 pmol mỗi đoạn với mỗi WF1 và

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành tại phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học Thủy sản, Trung tâm Công nghệ Sinh học từ tháng 4/2012 đến tháng 12/2015.

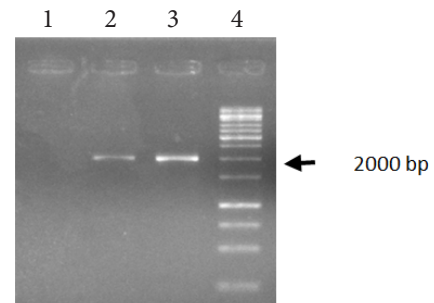
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả nghiên cứu

3.1.1. Phân lập và định danh vi khuẩn

Đĩa *Vibrio* phân lập trên môi trường TCBS từ Chi cục nuôi trồng Thủy Sản tỉnh Bạc Liêu sau khi mang về được cấy truyền lại trên môi trường VHA để quan sát hình thái khuẩn lạc trên môi trường này. Qua quan sát thấy rằng chủng phát sáng sau khoảng 18 giờ cấy (Hình 4). Đồng thời, khuẩn lạc trên môi trường VHA có hình tròn, nhỏ, đường kính khoảng 1-2 mm, có màu xanh lá cây sáng bóng ở bên ngoài và màu xanh đậm tối ở giữa. Một số khuẩn lạc có vòng sáng viền bên ngoài giống với mô tả về hình thái khuẩn lạc *V. harveyi* lạc trên môi trường VHA trong nghiên cứu của Lachlan Harris và cộng tác viên (1996).

DNA bộ gen được sử dụng làm bản mẫu để khuếch đại vùng trình tự 2048 bp từ vị trí 1759 đến vị trí 3806 của operon *LuxN* (gb/L13940.1/VIBLUXLMN) với cặp mồi F-*luxN* + R-*luxN*. Kết quả chạy điện di sản phẩm PCR có băng đặc trưng 2048 bp đặc hiệu của *V. harveyi* (Hình 5).

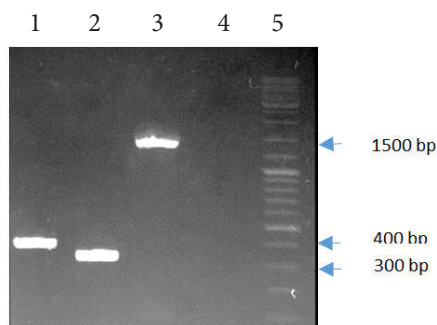


Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi khuếch đại gen *luxN*. (1): chứng âm nước; (2), (3): khuẩn lạc *V. harveyi*; (4): thang DNA

WR2 cho sản phẩm có nhiều băng trên bản gel điện di. Tinh sạch băng cho kết quả đúng kích thước của Δ HKTwzz trên gel bằng kit Introns (Hàn Quốc) cho ra đúng một băng có kích thước khoảng hơn 2000 bp (Hình 7).

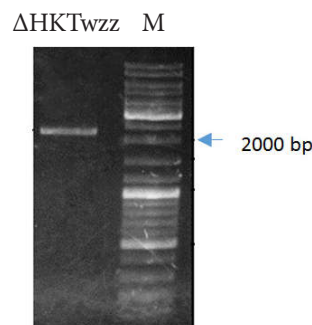
Véc tơ pGP704::HKTwzz được cắt mở vòng với *NdeI* sẽ cho sản phẩm có 1 băng có kích thước khoảng 5845 bp vì pGP704 có kích thước là 3703 bp và Δ HKTwzz có kích thước là 2142 bp. Sản phẩm

cắt cho ra kết quả khoảng gần 6000 bp (Hình 8) và được bất hoạt 2 đầu 5'-P bằng enzyme Antarctic Phosphatase. Sản phẩm cắt sau khi bất hoạt đầu 5'-P được tinh sạch bằng cồn để thu nhận phân đoạn pGP704::HKT_{wzz} ở dạng thẳng có 2 đầu là vị trí cắt của *NdeI*.



Hình 6. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mỗi khuếch đại gen *Hwzz* (1), *Twzz* (2), kanamycin (3), chứng âm là nước (4), thang DNA (5)

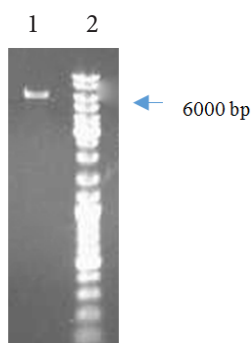
Plamid tái tổ hợp pJET::Ptac-VP28 được cắt với *NdeI* cho ra sản phẩm có 2 băng. Một băng là phân đoạn của Ptac-VP28 có kích thước là ~ 700 bp có 2 đầu là vị trí cắt so le của *NdeI*. Một băng là phân đoạn còn lại của pJET có kích thước là 2974 bp (Hình 9).



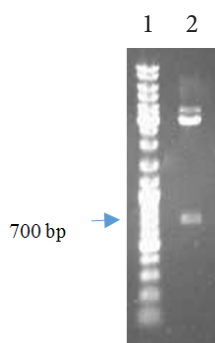
Hình 7. Kết quả điện di sản phẩm tinh sạch ΔHKT_{wzz}

Sản phẩm nối được tạo dòng trong *E. coli* SM10λpir và chọn lọc trên môi trường LB + ampicilin (100 μg/ml) + kanamycin (100 μg/ml). Vì trong ΔHKT_{wzz} có chứa gen kháng kanamycin nên các khuẩn lạc được tạo dòng thành công sẽ mọc trên môi trường chọn lọc này.

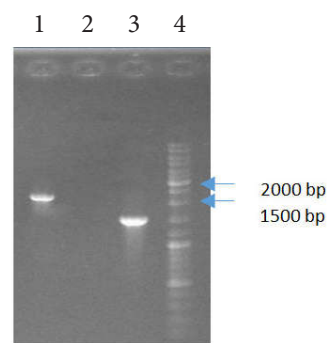
Kết quả kiểm tra khuẩn lạc với cặp mỗi KF và KR, cặp mỗi khuếch đại gen kháng kanamycin và nằm 2 bên vị trí cắt *NdeI*: khi không có gen VP28 chèn vào tại vị trí *NdeI* thì sản phẩm khuếch đại từ cặp mỗi KF và KR cho kích thước là 1498 bp; nếu có Ptac-VP28 chèn vào thì sản phẩm khuếch đại cho kích thước là 2196 bp (Hình 10).



Hình 8. Kết quả điện di sản phẩm cắt pGP704::HKT_{wzz}.
(1): sản phẩm cắt pGP704::HKT_{wzz} với *NdeI*; (2) thang DNA



Hình 9. Sản phẩm cắt pJET::Ptac-VP28.
(1): thang DNA; (2): sản phẩm cắt pJET::TAC-VP28 với *NdeI*

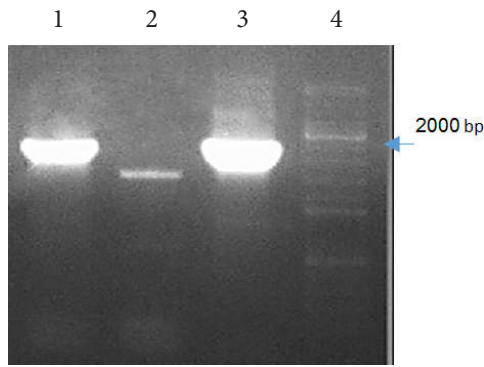


Hình 10. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc với cặp mỗi KF và KR.
(1) Khuẩn lạc *E. coli* SM10λpir::pGP704::ΔHKT_{wzz}::Ptac-VP28; (2) chứng âm là nước; (3): SM10λpir::pGP704::HKT_{wzz}; (4): thang DNA

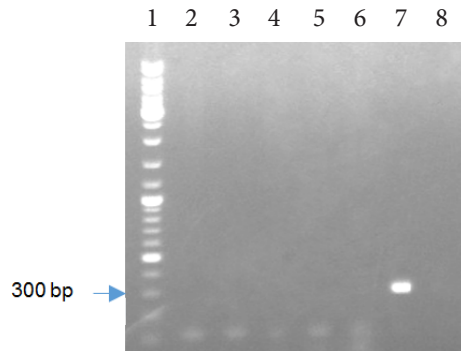
3.1.3. Tiếp hợp và kiểm tra chủng đột biến

Quá trình tạo đột biến gen hoang dại đã được thay thế bằng gen kháng kanamycin gắn với vùng trình tự Ptac + VP28 nhờ cơ chế tái tổ hợp tương đồng ở vị trí H và T của cassette với vị trí H và T

trên gen hoang dại. Khi kiểm tra khuẩn lạc tiếp hợp với mỗi KF+KR phát hiện vùng trình tự gồm gen kháng kanamycin gắn với trình tự Ptac::VP28 có kích thước khoảng 2200 bp so với đối chứng dương là SM10λpir::pGP704::Ptac-VP28 (Hình 11).



Hình 11. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuẩn lạc trên đĩa tiếp hợp với cặp mỗi KF và KR. 1: khuẩn lạc tiếp hợp; 2: SM10λpir::pGP704:: HKTWzz; 3: SM10λpir::pGP704:: ΔHKTWzz::Ptac-VP28; 4: thang DNA



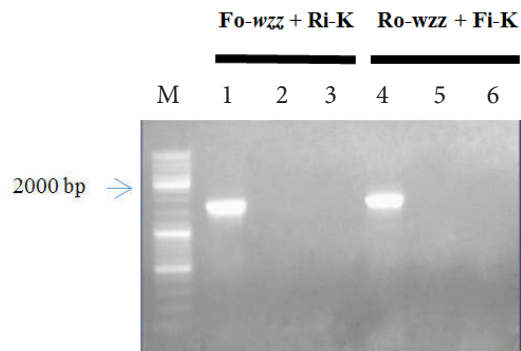
Hình 12. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR các khuẩn lạc đột biến với cặp mỗi Fi-wzz + Ri-wzz. (1): thang DNA; (2-6): các khuẩn lạc cấy truyền từ khuẩn lạc đột biến trên đĩa tiếp hợp; (7): khuẩn lạc *V. harveyi* hoang dại BL1; (8): chứng âm là nước

3.1.4. Biểu hiện protein vỏ VP28 trong chủng đột biến

Kháng thể đa dòng chuột kháng VP28 có khả năng bắt đặc hiệu kháng nguyên VP28 trên màng lai. Đồng thời, kháng thể sơ cấp này sẽ bị bắt đặc hiệu bởi kháng thể sơ cấp (kháng thể thô kháng kháng thể chuột) và hiện màu khi tiếp xúc với chất tạo màu DAB (3,3'-diaminobenzidine). Kết quả kiểm tra biểu hiện cho thấy có sự biểu hiện protein vỏ VP28 trong chủng *V. harveyi* đột biến gen *wzz* mang gen mã hóa protein vỏ VP28 của vi rút gây bệnh đốm trắng.

Ở kết quả phân tích SDS-PAGE không cho thấy sự khác biệt rõ ràng trong hệ protein tổng giữa chủng *V. harveyi* đột biến gen *wzz* mang gen mã hóa protein vỏ VP28 của vi rút gây bệnh đốm trắng (VH-WzM::Ptac-VP28) và chủng *V. harveyi* đột biến gen *wzz* không chứa gen mã hóa protein vỏ VP28 (VH-WzM) cũng như chủng *V. harveyi* hoang dại BL1 so với đối chứng dương là chủng

Khi kiểm tra với mỗi Fi-wzz + Ri-wzz để khuếch đại vùng trình tự nằm bên trong gen *wzz* từ vị trí 460070 đến vị trí 460365. Vùng này sẽ bị loại bỏ trong quá trình gây đột biến. Kết quả kiểm tra các khuẩn lạc đột biến sau khi cấy truyền đều không có sự tồn tại của vùng này (Hình 12) so với đối chứng dương là chủng *V. harveyi* hoang dại cho bằng có kích thước khoảng 300 bp. Khi kiểm tra với cặp mỗi Fo-wzz + Ri-K với mỗi Fo-wzz nằm trên genome của *V. harveyi*, nằm ngoài mỗi WF1 cho kích thước khoảng 1700 bp; tương tự kiểm tra với cặp mỗi Ro-wzz + Fi-K với trình tự mỗi Ro-wzz nằm trên genome của *V. harveyi*, nằm ngoài mỗi WR2 cho kích thước khoảng 2000 bp. Cả hai cặp mỗi cho phép xác định cassette có được chèn thẳng trực tiếp vào trong bộ gen của *V. harveyi* hay không (Hình 13).



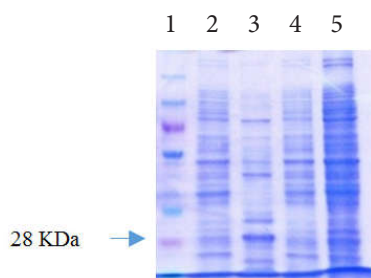
Hình 13. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR các khuẩn lạc đột biến với cặp mỗi kết hợp Fo-wzz + Ri-K và Ro-wzz + Fi-K. (1, 4): khuẩn lạc đột biến; (2, 5): khuẩn lạc *V. harveyi* hoang dại BL1; (3, 6): SM10λpir::pGP704:: ΔHKTWzz::Ptac-VP28

E. coli BL21::pAmCyan1-N1::Ptac-VP28 biểu hiện mạnh protein vỏ VP28 ở băng 28 KDa (Hình 14). Khi phân tích Western Blot thấy rằng chủng đột biến VH-WzM::Ptac-VP28 có khả năng biểu hiện protein vỏ VP28 so với đối chứng dương là *E. coli* BL21::pAmCyan1-N1::Ptac-VP28 (Hình 15).

3.2. Thảo luận

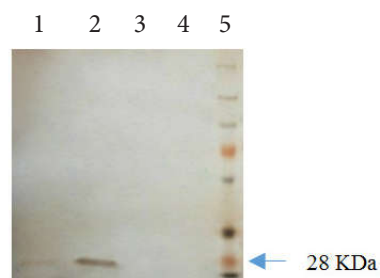
Nghiên cứu này đã tạo được chủng *V. harveyi* đột biến gen *wzz* biểu hiện protein vỏ VP28 của vi rút gây bệnh đốm trắng bằng phương pháp gây đột biến gen dựa vào cơ chế trao đổi chéo giữa 2 vùng trình tự tương đồng ở vi khuẩn. Hiện nay, trên thế giới vẫn chưa có công bố nào về việc gây đột biến bằng phương pháp loại bỏ một phần gen *wzz* trên *V. harveyi* hướng đến như là vắc xin phòng bệnh cho tôm. Năm 2011, chủng *V. harveyi* bất hoạt đã được chứng minh là có khả năng làm gia tăng đáp ứng miễn dịch ở tôm (Rowley *et al.*, 2011). Năm 2012, một

hướng nghiên cứu về việc gây đột biến ngẫu nhiên chủng *V. harveyi* T4D bằng kháng sinh rifampicin để tạo vắc xin cho cá bơn (Sun *et al.*, 2012). Điều này chứng tỏ *V. harveyi* bất hoạt hoặc nhược độc có khả năng sinh miễn dịch. Tạo vi khuẩn nhược độc bằng knock-out gen là một hướng nghiên cứu rất mới hướng đến việc tạo vắc xin vi khuẩn sống nhược độc để tiếp cận bằng con đường ngâm hoặc cho ăn đối với tôm. Nghiên cứu sử dụng promoter TAC (Ptac) trong chủng *V. cholerae* để biểu hiện độc tố B của *E. coli* (CtxB) bằng véc tơ pETR1, Ptac đã được chứng minh là phù hợp nhất khi biểu hiện trong chủng *V. cholerae* (John M *et al.*, 1999). Do không



Hình 14. Kết quả phân tích SDS-PAGE kiểm tra biểu hiện protein vỏ VP28. (1): thang protein; (2): chủng đột biến VH-WzM::Ptac-VP28; (3): chủng BL21::pAmCyan1-N1::Ptac-VP28; (4): chủng đột biến gen *wzz* không chứa Ptac-VP28; (5): chủng *V. harveyi* hoang dại BL

thể tiến hành các phương pháp biến nạp véc tơ tái tổ hợp biểu hiện VP28 vào *V. harveyi* nên nhóm nghiên cứu đã chèn trực tiếp Ptac-VP28 vào bộ gen của vi khuẩn *V. harveyi*. Chủng VH-WzM::Ptac-VP28 có khả năng biểu hiện protein vỏ VP28 nhưng hiệu quả không cao so với đối chứng dương *E. coli* BL21::pAmCyan1-N1::Ptac-VP28. Có thể giải thích nguyên nhân là do việc chèn trực tiếp gen mã hóa cho protein vỏ VP28 vào bộ gen *V. harveyi* làm giảm đi rất nhiều số lượng bản sao của gen này so với việc sử dụng véc tơ tái tổ hợp để biểu hiện. Tuy nhiên, hiệu quả bảo vệ chủng *V. harveyi* đột biến này cần phải được thử nghiệm trên tôm ở giai đoạn tiếp theo.



Hình 15. Kết quả phân tích Western Blot kiểm tra biểu hiện protein vỏ VP28. (1): chủng đột biến VH-WzM::Ptac-VP28; (2): chủng BL21::pAmCyan1-N1::Ptac-VP28; (3): chủng đột biến gen *wzz* không chứa Ptac-VP28; (4): chủng *V. harveyi* hoang dại BL; (5): thang protein

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Đã tạo được chủng *Vibrio harveyi* đột biến gen *wzz* bằng phương pháp knock-out gen và có khả năng biểu hiện protein vỏ VP28 của vi rút gây bệnh đốm trắng (WSSV) trên tôm.

4.2. Đề nghị

Đây là chủng vi khuẩn đột biến có tiềm năng bảo vệ tôm kháng lại vi rút gây bệnh đốm trắng. Do đó, cần triển khai các nghiên cứu về thử nghiệm độc lực của chủng đột biến và đánh giá hiệu quả bảo vệ của chủng này kháng lại WSSV.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Franco AV, Liu D, Reeves PR, 1998. The Wzz (Cld) Protein in *Escherichia coli*: Amino Acid Sequence Variation Determines O-Antigen Chain Length Specificity. *Journal of bacteriology*, 180: 2670-2675.

Hernandez G, Olmos J, 2004. Molecular identification of pathogenic and nonpathogenic strains of *V. harveyi* using PCR and RAPD. *Applied Microbiology Biotechnology*, 63: 722-727.

Harris L, Owens L, Smith S, 1996. A selective and differential medium for *Vibrio harveyi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3548-3550.

John M, Crean TI, Calderwood SB, and Ryan ET, 2000. In Vitro and In Vivo Analyses of Constitutive and In Vivo-Induced Promoters in Attenuated Vaccine and Vector. *Infection and immunity*, 68: 1171-1175.

Liu PC, Lee KK, Yii KC, Kou GH, Chen SN, 1996. Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus laponicils*. *Curr Microbiol*, 33: 129-132.

Najdenski HI, Golkocheva E, Vesselinova A, Bengoechea JA, Skurnik M, 2003. Proper expression of the O-antigen of lipopolysaccharide is essential for the virulence of *Yersinia enterocolitica* O:8 in experimental oral infection of rabbits. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 38: 97-106.

Qi Y, Yi G, Wang Z, Yao L, Qian J and Hu L, 2004. VP28 of Shrimp White Spot Syndrome Virus Is Involved in the Attachment and Penetration into Shrimp Cells. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 726-734.

Rowley AF, Powell A, 2007. Invertebrate Immune Systems-Specific, Quasi-Specific, or Nonspecific?. *The Journal of Immunology*, 179:7209-7214.

Rowley AF, Powell A, Pope EC, 2011. Enhanced immune defences in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) post-exposure to a vibrio vaccine. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107: 95-9.

Sun L, Hu YH, Deng T, Sun BG, 2012. Development and efficacy of an attenuated *Vibrio harveyi* vaccine candidate with cross protectivity against

Vibrio alginolyticus. *Fish & Shellfish Immunology*, 32: 1155 -1161.

Thune RL, Fernandez DH, Battista JR, 2011. An *aroA* Mutant of *Edwardsiella ictaluri* Is Safe and Efficacious as a Live Attenuated Vaccine. *Journal of Aquatic Animal Health*, 11: 358-372.

A mutant *Vibrio harveyi* strain knocked-out *wzz* gene expressing the VP28 antigen of white spot syndrom virus

Mai Thu Thao, Tran Pham Vu Linh, Ngo Huynh Phuong Thao,
Lam Vy Nguyen, Nguyen Quoc Binh

Abstract

There are many approaches to develop biological products which can protect shrimp from serious diseases. In this study, we created a mutant *Vibrio harveyi* strain, the bacteria causes the luminescent disease on shrimp by knocking-out *wzz* gene (O-antigen gene determinant chain length) and inserted VP28 gene encoding the envelop protein of the virus WSSV causing White spots syndrome in gene knocking-out site. Firstly, HKT_{wzz} cassette (Δ HKT) including H_{wzz} sequence (the head of *wzz* gene); K (kanamycin resistance gene), T_{wzz} (the tail of *wzz* gene) was generated by PCR overlap. Then Ptac-VP28 sequence was inserted into the site of *NdeI* enzyme located on the HKT_{wzz} cassette. The Δ HKT_{wzz}::Ptac-VP28 cassette was inserted into pGP704 and cloned into *E. coli* SM10 λ pir. The mutant *Vibrio harveyi* strain was generated by conjugating between the donor *E. coli* SM10 λ pir::pGP704:: Δ HKT::Ptac-VP28 strain and the wild type receipt of *Vibrio harveyi* BL1 strain (Bac Lieu province). The test of SDS-PAGE and Western Blot showed that the mutant *Vibrio harveyi* strain have been able to express VP28 protein.

Key words: Conjugation, knock-out gene, pGP704, SM10 λ pir, *Vibrio harveyi*

Ngày nhận bài: 7/6/2018

Ngày phản biện: 15/6/2018

Người phản biện: TS. Lê Hồng Phước

Ngày duyệt đăng: 16/7/2018