

TẠO DÒNG, BIỂU HIỆN VÀ TINH SẠCH PROTEIN TÁI TỔ HỢP ĐOẠN ĐẦU PROTEIN TOXA CỦA *PASTEURELLA MULTOCIDA*

Vũ Khắc Hùng¹, Trịnh Thị Thu Hằng¹,
Đỗ Thị Trung Anh², Nguyễn Thị Thu Thủy¹, Nguyễn Xuân Trường¹

TÓM TẮT

Những nghiên cứu trước đây đã chứng minh *toxA* là gen độc tố chính của *Pasteurella multocida*. Vì vậy protein ToxA là một yếu tố tiềm năng cho các nghiên cứu chế tạo vaccin tái tổ hợp phòng bệnh tụ huyết trùng lợn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tạo dòng và biểu hiện đoạn gen 1,4kb của ToxA mã hóa trình tự axit amin từ 1 đến 487 (Tox1) trên vector biểu hiện pET32b trong *Escherichia coli* BL21 (DE3). Protein tái tổ hợp Tox1 được biểu hiện mạnh khi cảm ứng với IPTG 1mM và ethanol 3%. Sử dụng cột sắc ký ái lực Ni-NTA, chúng tôi đã tiến hành tinh sạch Tox1 sau khi hòa tan biến tính trong dung dịch đệm chứa urea 6M. Kết quả điện di SDS-PAGE và Western blot cho thấy, protein Tox1 đã được biểu hiện chính xác và tinh sạch, đạt tiêu chuẩn về độ tinh khiết. Đây sẽ là nguồn nguyên liệu ban đầu cho những nghiên cứu tiếp theo của chúng tôi để chế tạo vaccin tái tổ hợp phòng bệnh tụ huyết trùng lợn do vi khuẩn *Pasteurella multocida* gây ra.

Từ khóa: *Pasteurella multocida*, vaccin tái tổ hợp, tạo dòng, biểu hiện, tinh sạch protein.

Cloning, expressing and purification of recombinant protein ToxA n-terminal in *Pasteurella multocida*

Vu Khắc Hùng, Trịnh Thị Thu Hằng,
Do Thị Trung Anh, Nguyễn Thị Thu Thủy, Nguyễn Xuân Trường

SUMMARY

ToxA has been documented to be the main toxin of *Pasteurella multocida*. Therefore, it is a potential factor for the studies to produce recombinant vaccines against Pasteurellosis in pigs. In this study, we cloned and expressed Tox1 protein, a N-fragment of ToxA (from amino acid 1 to amino acid 487), in *Escherichia coli* BL21 with pET32b vector. The recombinant Tox1 protein was expressed well when induced with 1mM IPTG and 3% ethanol. The protein was denaturated and dissolved in lysis buffer containing 6M urea and purified via Ni-NTA column. The SDS-PAGE and Western blot results showed that Tox1 was correctly expressed and well-purified. This is the preliminary material for our further studies to produce recombinant vaccine against Pasteurellosis in pigs caused by *Pasteurella multocida*.

Keywords: *Pasteurella multocida*, recombinant vaccine, cloning, expressing, protein purification.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh tụ huyết trùng ở lợn do vi khuẩn *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) gây ra. Bệnh thường xuyên xảy ra và gây hậu quả nghiêm trọng, đặc biệt hay gây bệnh kể phát là

hội chứng rối loạn hô hấp - sinh sản (tai xanh). Ở Việt Nam, bệnh tụ huyết trùng là một trong những nguyên nhân chính gây chết lợn tại các ổ dịch tai xanh. Vi khuẩn *P. multocida* gây bệnh trên lợn thường thuộc nhóm A, B và D [3].

¹ Bộ môn Công nghệ sinh học, Phân viện Thú y miền Trung

² Trường Đại học Nha Trang

Trong những năm 90 của thế kỷ trước, có 20 - 25 tỉnh thông báo có bệnh tụ huyết trùng lưu hành tại địa phương. Trong các năm từ 1996 – 1998, trên cả nước đã xảy ra 620 ổ dịch tụ huyết trùng lợn với 145.337 con mắc bệnh [1,2]. Vào những tháng cuối năm 2007, tại một số huyện như Thăng Bình (Quảng Nam) đã ghi nhận có đến 3000 con lợn chết do tụ huyết trùng ghép dịch tả lợn; trước đó tại huyện Duy Xuyên cùng tỉnh, cũng đã ghi nhận được 300 con lợn chết với triệu chứng bệnh tương tự (theo Việt Báo, 2007). Vào quý I năm 2012, theo thống kê của Cơ quan thú y vùng IV, bệnh tụ huyết trùng và bệnh phó thương hàn xuất hiện liên tiếp ở 5 tỉnh Bình Thuận, Bến Tre, Ninh Thuận, Tiền Giang, và Bà Rịa - Vũng Tàu, gây chết 1.258 con heo (theo Báo Mới, 2012). Tại huyện Kỳ Sơn, (Nghệ An), riêng tháng 12/2017 có đến 100 gia súc gồm cả trâu, bò và lợn chết do tụ huyết trùng (theo thống kê của Chi cục chăn nuôi Nghệ An, 2018). Cho đến nay, mỗi năm vẫn có 20-25 tỉnh thông báo có bệnh này lưu hành.

Bệnh tụ huyết trùng trên lợn gây thiệt hại nặng nề và rất khó chữa trị, chi phí điều trị cao gây khó khăn cho bà con nông dân. Trước tình hình đó, yêu cầu đề ra là cần phải có biện pháp phòng bệnh hiệu quả. Một số loại vacxin phòng bệnh do vi khuẩn *P. multocida* gây ra đang được sử dụng rộng rãi ở châu Á là vacxin bất hoạt được nhũ hoá trong gel nhôm hydroxide, tuy nhiên nó không tạo được miễn dịch lâu dài [16]. Việc sử dụng công nghệ tái tổ hợp để phát triển vacxin có thể sớm cách mạng hóa các loại vacxin hiện tại. Kháng nguyên tái tổ hợp có thể được tổng hợp từ các hệ thống biểu hiện khác nhau sau khi kháng nguyên đích được xác định. Các protein tái tổ hợp được dùng làm vacxin tiểu phần đã được báo cáo là đạt các chỉ tiêu an toàn và hiệu lực [9]. Do đó công nghệ tái tổ hợp hứa hẹn có thể được sử dụng để phát triển một loại vacxin hiệu quả giúp bảo vệ, chống lại hầu hết các chủng *P. multocida*. Để tạo nguồn nguyên liệu ban đầu cho việc chế

tạo vacxin tái tổ hợp phòng bệnh tụ huyết trùng do vi khuẩn *P. multocida* gây ra trên lợn, chúng tôi đã tiến hành tạo dòng, biểu hiện và tinh sạch đoạn đầu protein ToxA, từ axit amin 1 đến axit amin 487 (Tox1) trên vi khuẩn *E. coli* BL21.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Chủng vi sinh vật: Chủng *P. multocida* NCTC12178 serotype D, mang gen độc tố *ToxA* được cung cấp bởi Trung tâm chủng giống Hoàng gia Anh (Public Health England). DNA tổng số của chủng vi khuẩn này được sử dụng làm nguồn để nhân lên trình tự gen mã hóa *Tox1*.

Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5α được dùng để tạo dòng, lưu giữ plasmid tái tổ hợp. Chủng vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) được dùng trong biểu hiện protein tái tổ hợp.

Vector pET32b (Thermo fisher scientific) mang gen kháng ampicillin, có trình tự T7 promotor, cảm ứng sản sinh protein bằng IPTG và có trình tự mã hóa cho đuôi dung hợp -6xHistidine (His). Đuôi dung hợp -6xHis giúp tăng biểu hiện của protein đích và giúp tinh chế protein bằng Ni-NTA.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Môi của phản ứng PCR

Các môi cho phản ứng PCR được tổng hợp bởi công ty First base (Singapore).

Chúng tôi thiết kế cặp môi có gắn thêm 2 vị trí của 2 enzyme BamHI và Xho ở đầu 5' của môi xuôi và môi ngược như sau:

Tox1F: 5'-GGATCCCAT-GAAAACAAAACATTTTCTTAAGCTC-3'

Tox1R: AAAGTCGACTTGAGCTAAA-GCTTGTTC-3'

T7promotor: TAATACGACTCACTATAGGG

2.2.2. Tạo dòng plasmid pET32b/Tox1

Đoạn gen *Tox1* được thu nhận bằng phản ứng PCR với khuôn là DNA tổng số của chủng *P.*

multocida đã được kiểm tra dương tính với gen *toxA*. Phản ứng PCR sử dụng cặp mồi Tox1F/Tox1R với chu trình nhiệt: 95°C/3 phút, 35 chu kỳ của 95°C/30s, 60°C/30s, 72°C/60s, sau đó xử lý 72°C/10 phút và giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR sau đó được gắn vào vector tách dòng pGEMT và biến nạp vào *E. coli* DH5α. Sau khi kiểm tra, trình tự đoạn *Tox1* được cắt khỏi vector pGEMT bằng enzyme BamHI và XhoI, tinh sạch và được nối với vector pET32b tại vị trí của 2 enzyme tương ứng. Plasmid tạo thành được biến nạp vào *E. coli* DH5α. Những khuẩn lạc tạo thành sau đó được sàng lọc bằng phản ứng colony PCR bằng mồi T7 promotor và Tox1R với chu trình nhiệt: 95°C/3 phút, 40 chu kỳ của 95°C/30s, 60°C/30s, 72°C/60s, sau đó xử lý 72°C/10 phút và giữ ở 4°C.

Sau khi sàng lọc, những khuẩn lạc mang plasmid pET32b/Tox1 sẽ được nuôi cấy, tách chiết plasmid bằng bộ kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), kiểm tra đoạn cài bằng phản ứng cắt với enzyme giới hạn BamHI và XhoI, và được giải trình tự tại công ty Firstbase, Singapore.

2.2.3. Biểu hiện protein Tox1 trong *E. coli* BL21 (DE3)

Plasmid pET32b/Tox1 được biến nạp vào *E. coli* BL21(DE3) để biểu hiện protein. Các khuẩn lạc được sàng lọc trên môi trường LB có bổ sung 100μg/ml ampicillin, và kiểm tra lại bằng phản ứng colony PCR bằng mồi T7 promotor và Tox1R với chu trình nhiệt: 95°C/3 phút, 40 chu kỳ của 95°C/30s, 60°C/30s, 72°C/60s, sau đó xử lý 72°C/10 phút và giữ ở 4°C.

Khuẩn lạc mang plasmid pET32b/Tox1 được nuôi cấy trong môi trường LB có bổ sung 100μg/ml ampicillin và cảm ứng với IPTG và ethanol khi đạt mật độ $OD_{600}=0,5$, sau đó được nuôi cấy trong 18 giờ tại 28°C.

2.2.4. Tinh sạch protein

Sau khi cảm ứng biểu hiện protein Tox1, sinh khối vi khuẩn được ủ trong dung dịch đệm phosphate buffered saline (PBS) chứa lysozyme 1mg/ml và urea 6M ở 4°C. Sau 1 giờ, tế bào

được phá vỡ bằng sóng siêu âm tần số 20KHz trong 10 phút với chu kỳ 10 giây đánh, 10 giây nghỉ. Dịch tế bào sau đó được ly tâm 13000 vòng/phút, 5 phút, loại bỏ cặn, và ủ lắng với hạt Ni-NTA (Promega) trong 1 giờ tại 4°C. Hạt Ni-NTA sau đó được rửa 5 lần với dung dịch rửa (PBS, urea 6M, Imidazole 20mM) để loại bỏ các protein không mong muốn. Cuối cùng, protein tái tổ hợp Tox1 được tách khỏi hạt Ni-NTA bằng dung dịch Imidazole 250mM.

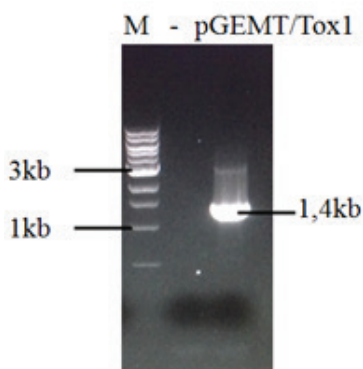
2.2.5. Phản ứng Western blot

Dịch protein thu được sau khi tinh sạch được chạy phân tách trên gel SDS-acrylamide 10%, sau đó được chuyển sang màng nitrocellulose bằng hệ thống máy chuyển màng ECL semi-dry blotters (Amersham™) tại điện thế 25V trong 1 giờ. Màng chứa protein sau khi được ủ trong dung dịch skim milk 5% trong 1 giờ tại nhiệt độ phòng sẽ được ủ lắng với dung dịch chứa kháng thể sơ cấp đặc hiệu của ToxA với tỷ lệ pha loãng là 1: 5000 (Anti-Pasteurella multocida Toxin antibody, rabbit polyclonal, BioAcademia 01-507) ở 4°C qua đêm. Sau khi rửa 3 lần với dung dịch rửa TPBS (PBS, Tween 20 0,1%), màng được ủ lắng với dung dịch chứa kháng thể thứ cấp (horseradish peroxidase secondary rabbit antibody, Amersham™) với tỷ lệ pha loãng 1:10.000 tại nhiệt độ phòng. Sau 1 giờ, màng được rửa 5 lần với dung dịch rửa và ngâm vào dung dịch thuốc nhuộm 3, 3', 5', 5'-Tetramethylbenzidine (TMB) để đọc kết quả.

III. KẾT QUẢ

3.1. Tạo dòng pET32b/Tox1

Đoạn gen *Tox1* trong nghiên cứu này được thiết kế mã hóa cho trình tự axit amin từ 1 đến axit 487 của độc tố *toxA*. Đoạn gen *Tox1* được nhân lên bằng phản ứng PCR và nối vào pGEMT. Kết quả kiểm tra plasmid pGEMT/Tox1 bằng cặp mồi Tox1F/Tox1R (hình 1) cho thấy 1 vạch DNA sáng rõ, kích thước 1,4kb, tương đương với kích thước của đoạn gen *Tox1*.



Hình 1. Kết quả PCR kiểm tra sự tạo dòng thành công plasmid pGEMT/Tox1 trên *E.coli* DH5α

M: thang DNA chuẩn (Invitrogen),
(-): đối chứng âm

Đoạn gen *Tox1* sau đó được nối vào vector pET32b như mô tả ở trên và được sàng lọc bằng phản ứng colony PCR với cặp mồi T7 promotor/*Tox1*R. Kết quả sàng lọc (hình 2) thu được những khuẩn lạc dương tính với 1 vạch điện di rõ nét, kích thước 1,4kb. Như vậy, chúng tôi đã tạo dòng thành công gen *Tox1* trên plasmid biểu hiện pET32b.



Hình 2. Kết quả colony PCR kiểm tra sự tạo dòng thành công plasmid pET32b/Tox1 trong *E.coli* DH5α

M: thang ADN chuẩn (Invitrogen),
(+): đối chứng dương, (-): đối chứng âm; 1-10: sản phẩm colony PCR các khuẩn lạc từ 1-10.

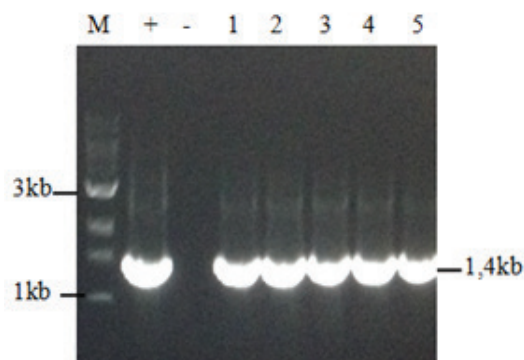
Plasmid từ những khuẩn lạc dương tính được tách chiết, gửi giải trình tự, và so sánh với trình tự gốc của gen *ToxA* trên ngân hàng Genbank (hình 3). Trình tự này có kích thước 1461bp, mã hóa cho trình tự axit amin hoàn toàn tương đồng với trình tự protein ToxA từ vị trí axit amin 1 đến axit amin 487 của ToxA (Mã số: AAW57319.1). Như vậy trình tự đoạn gen chúng tôi tạo dòng được hoàn toàn trùng khớp với trình tự của ToxA trên Ngân hàng gen, không có sai sót về axit amin nào được phát hiện.

ToxA [Pasteurella multocida]
Sequence ID: [AAW57319.1](#) Length: 1285 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 487		GenPept	Graphics	Next Match		Previous Match	
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame	
1020 bits(2638)	0.0	Compositional matrix adjust.	486/487(99%)	487/487(100%)	0/487(0%)	+1	
Query	1	MKTKHFFNSDFTVKGKSADEIFRRLCTDHPDKQLNNVKNKEVFINRFGQMMLDTPNPKKI					180
Subject	1	MKTKHFFNSDFTVKGKSADEIFRRLCTDHPDKQLNNVKNKEVFINRFGQMMLDTPNPKKI					60
Query	181	VEKIINEGLEKQGLKNIIDFETTYFNIIFSSSDSSDGNVFNHNSLSESYRVIDACLMNIFVE					360
Subject	61	VEKIINEGLEKQGLKNIIDFETTYFNIIFSSSDSSDGNVFNHNSLSESYRVIDACLMNIFVE					120
Query	361	RYFDDWDLNLSLASNGIYSVGKEGAYYPDHDYGPPEYFVNGPNEQIYHSRVIAIDILYARS					540
Subject	121	RYFDDWDLNLSLASNGIYSVGKEGAYYPDHDYGPPEYFVNGPNEQIYHSRVIAIDILYARS					180
Query	541	VNDEFKKYFMEYQKQAQLYTEMLSDTFAMAIQQYTRQILTDEGFLMVCNTYYGNKEEV					720
Subject	181	VNDEFKKYFMEYQKQAQLYTEMLSDTFAMAIQQYTRQILTDEGFLMVCNTYYGNKEEV					240
Query	721	QITLLDIYGVPSDIIICIEQKGLPTPKVILVPGGTQPFVEFLNTDDLKQWIAWHLKDNK					900
Subject	241	QITLLDIYGVPSDIIICIEQKGLPTPKVILVPGGTQPFVEFLNTDDLKQWIAWHLKDNK					300
Query	901	HMVAFRKHFSLKQRQEGETFTGIDKALQYIAEESFENPANKYILYNPHTLETENLFNIM					1080
Subject	301	HMVAFRKHFSLKQRQEGETFTGIDKALQYIAEESFENPANKYILYNPHTLETENLFNIM					360
Query	1081	KRTQRMLEDSDVQIRSNSEATRDVALSLETFISQLSAIDMLVPAVGIPINFALSATAL					1260
Subject	361	KRTQRMLEDSDVQIRSNSEATRDVALSLETFISQLSAIDMLVPAVGIPINFALSATAL					420
Query	1261	GLSSDIVVNGDSYEKKRYGIGSLVQSALFTGINLIFVISETAEILSSFSRTIEDIPAFFT					1440
Subject	421	GLSSDIVVNGDSYEKKRYGIGSLVQSALFTGINLIFVISETAEILSSFSRTIEDIPAFFT					480
Query	1441	EEQALAQ					1461
Subject	481	EEQALAQ					487

Hình 3. Kết quả phân tích trình tự đoạn gen *Tox1* được tạo dòng trong vector pET32b so với trình tự gen *Tox1* trên Ngân hàng gen (Mã số: AAW57319.1)

Plasmid đã được kiểm tra trình tự sau đó được biến nạp vào *E. coli* BL21 (DE3) và kiểm tra sự tồn tại qua nhiều đời bằng cách cấy chuyển 5 ngày liên tiếp. Kết quả kiểm tra tính ổn định của plasmid (hình 4) cho thấy plasmid ổn định và tồn tại qua nhiều đời cấy chuyển. Như vậy chúng tôi đã tạo dòng thành công đoạn gen *Tox1* trên *E. coli* BL21 (DE3), plasmid này ổn định và tồn tại qua nhiều đời

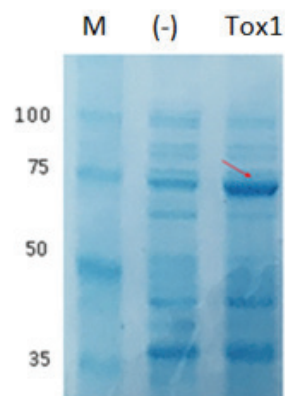


Hình 4. Kết quả colony PCR sau cấy chuyển 5 ngày liên tiếp

M: Thang chuẩn DNA (Invitrogen), (+): đối chứng dương, (-): đối chứng âm; 1-5: Mẫu ngày 1 đến ngày 5

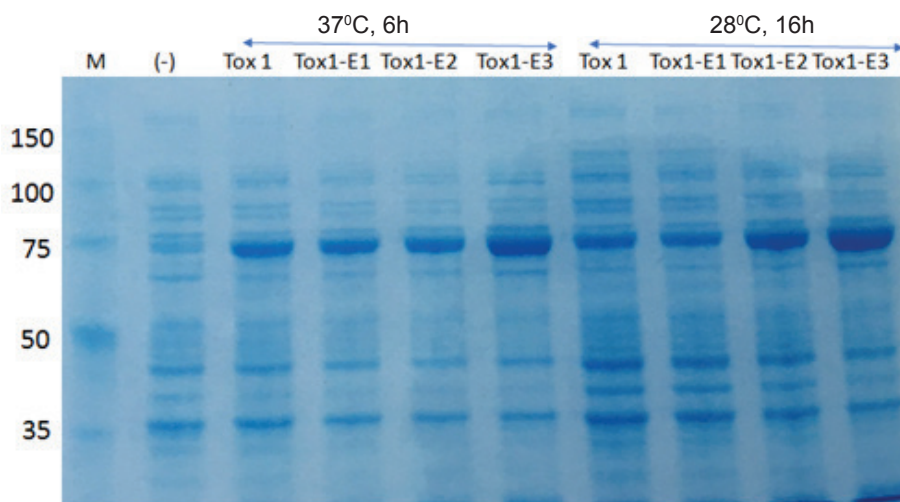
3.2. Cầm ứng biểu hiện protein *Tox1*

Kết quả biểu hiện protein *Tox1* sau 16 giờ nuôi cấy ở 28°C, cảm ứng IPTG 1mM được thể hiện như hình 5. Kết quả cho thấy ở mẫu cảm ứng xuất hiện một vạch protein đậm tại vị trí khoảng 70kDa, tương đương với kích thước của protein *Tox1*.



Hình 5. Kết quả biểu hiện protein *Tox1*

M: thang protein chuẩn (Promega)
(-): mẫu không cảm ứng IPTG, Tox1: mẫu cảm ứng với IPTG 1mM



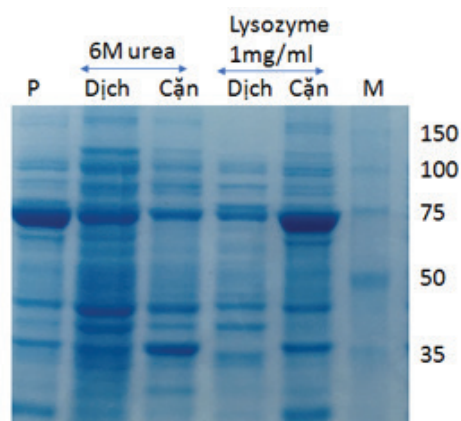
Hình 6. Khảo sát điều kiện biểu hiện của protein *Tox1*

M: thang chuẩn protein; (-): mẫu không cảm ứng IPTG; Tox1: mẫu cảm ứng với IPTG 1mM; Tox1-E1: mẫu biểu hiện protein *Tox1* cảm ứng IPTG 1mM, Ethanol 1%; Tox1-E2: mẫu biểu hiện protein *Tox1* cảm ứng IPTG 1mM, Ethanol 2%; Tox1-E3: mẫu biểu hiện protein *Tox1* cảm ứng IPTG 1mM, Ethanol 3%

Để thu được kết quả biểu hiện tốt nhất, chúng tôi kiểm tra khả năng biểu hiện Tox1 tại các nhiệt độ khác nhau và kết hợp cảm ứng IPTG với ethanol ở các nồng độ 1%, 2%, 3%. Kết quả thể hiện ở hình 6 cho thấy không có sự khác biệt trong biểu hiện protein Tox1 khi cảm ứng tại 37°C và 28°C, cảm ứng bằng IPTG 1mM và ethanol 3% cho biểu hiện Tox1 là mạnh nhất.

3.3. Tinh sạch protein Tox1

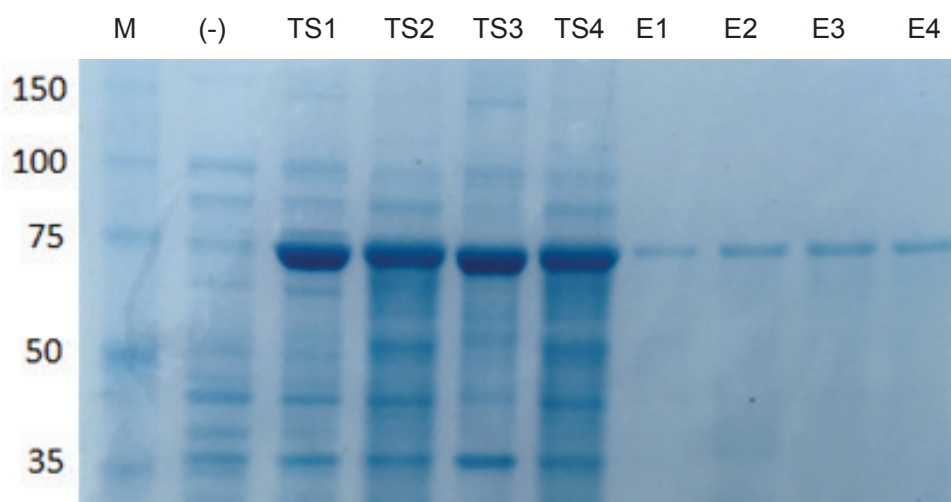
Kết quả kiểm tra tính tan được thể hiện ở hình 7 cho thấy, Tox1 là protein không hòa tan. Khi phá tế bào với dung dịch đệm chỉ chứa lysozyme 1mg/ml, toàn bộ protein Tox1 nằm trong phần cận tế bào. Vì vậy, chúng tôi phải bổ sung urea 6M vào dung dịch phá tế bào để hòa tan Tox1. Dung dịch thu được sau khi ly tâm sẽ được sử dụng để tinh sạch Tox1 bằng cột sắc ký sử dụng hạt Ni-NTA.



Hình 7. Kết quả kiểm tra độ hòa tan của protein Tox1

P: Protein tổng số trước khi phá tế bào, M: thang chuẩn protein (Promega)

Kết quả tinh sạch protein ở hình 8 cho thấy, dung dịch protein sau tinh sạch chỉ chứa một



Hình 8. Kết quả tinh sạch protein Tox1

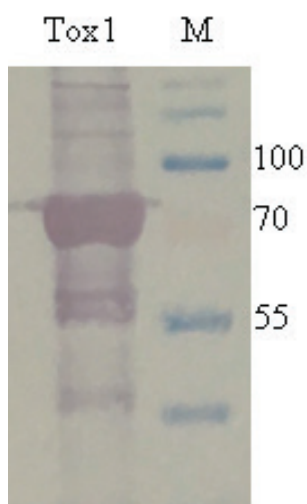
M: Thang protein chuẩn (Promega), (-): protein tổng số mẫu không cảm ứng, TS1-4: protein tổng số mẫu cảm ứng với IPTG và ethanol dùng để tinh sạch; E1-4: dịch protein sau tinh sạch

vạch protein có kích thước khoảng 70kDa, tương đương với kích thước của protein Tox1. Như vậy, protein biểu hiện đã được tinh sạch với độ tinh khiết cao, có thể được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.4. Kiểm tra protein tinh sạch bằng phản ứng Western blot

Để kiểm tra protein đã biểu hiện và được tinh sạch có chính xác là trình tự đầu của độc tố ToxA hay không, chúng tôi phân tách dịch

protein tinh sạch trên gel SDS-acrylamide, sau đó thực hiện phản ứng lai với kháng thể đặc hiệu của độc tố ToxA (Anti-Pasteurella multocida Toxin antibody, rabbit polyclonal, BioAcademia). Tương tác giữa kháng thể và protein được xác định bằng phản ứng màu giữa enzyme peroxidase và cơ chất TMB. Kết quả thể hiện ở hình 9 cho thấy, protein tinh sạch tại vị trí 70kDa có phản ứng dương tính rất mạnh với kháng thể đặc hiệu ToxA. Như vậy, protein biểu hiện và tinh sạch mà chúng tôi thu được chính xác là protein Tox1, là trình tự từ axit amin 1 đến axit amin 487 của ToxA.



Hình 9. Kết quả Western blot của protein tinh sạch với kháng thể đặc hiệu ToxA (Anti-Pasteurella multocida Toxin antibody, rabbit polyclonal, BioAcademia)

M: thang chuẩn protein (Thermo Scientific);

Tox1: mẫu protein tinh sạch

IV. THẢO LUẬN

ToxA là gen độc tố chính của *P. multocida*, rất nhiều tác giả đã dựa trên trình tự của gen *ToxA* để nghiên cứu độc lực của *P. multocida* cũng như tìm hướng sản xuất vaccin tái tổ hợp từ độc tố này. Vaccin tái tổ hợp dựa trên độc tố chính có đáp ứng miễn dịch tốt và an toàn hơn khi sử dụng vaccin toàn khuẩn [6, 8]. Protein ToxA gồm 1285 axit amin (aa) [7], là một dạng ngoại độc tố gây hoại tử niêm mạc (demonecrotic

toxin), gồm: đầu (PMT-N) vị trí từ aa 1 đến aa 568 là vùng liên kết thụ thể và vận chuyển độc tố vào tế bào vật chủ, đầu C (PMT-C) có vai trò tương tác và sửa đổi các protein G trong tế bào, gây độc cho tế bào vật chủ (5, 15). Trước đây, một số tác giả đã nghiên cứu một số phân đoạn của gen *ToxA* trong đáp ứng miễn dịch phòng bệnh tụ huyết trùng lợn [11, 12, 13]. Theo kết quả nghiên cứu của Lee và Jong Woo (2010), trình tự đầu C của *ToxA* có khả năng gây đáp ứng miễn dịch mạnh và có khả năng bảo hộ tốt trên động vật thí nghiệm (11). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã lựa chọn phân đoạn đầu của gen *ToxA*: *Tox1* (aa1-aa487) để tạo dòng biểu hiện và tinh sạch làm cơ sở ban đầu cho việc chế tạo vaccin tái tổ hợp phòng bệnh tụ huyết trùng lợn. Kết quả chúng tôi đã tạo dòng thành công gen *Tox1* trên *E. coli* BL21 (DE3), plasmid này ổn định qua nhiều đời. Protein Tox1 đã được tối ưu hóa điều kiện cảm ứng, biểu hiện tinh sạch thành công với độ tinh khiết cao, và có phản ứng dương tính với kháng thể đặc hiệu ToxA của *P. multocida*.

V. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tạo dòng, biểu hiện và tinh sạch thành công protein tái tổ hợp trình tự đầu của protein ToxA của vi khuẩn *P. multocida*. Kết quả này là cơ sở bước đầu để chúng tôi tiến hành các nghiên cứu tiếp theo để chế tạo vaccin tái tổ hợp phòng bệnh tụ huyết trùng trên lợn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cao Văn Hồng. 2002. *Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ bệnh tụ huyết trùng trâu, bò, lợn tại Đắc Lắc và một số biện pháp phòng trị*. Luận án Tiến sỹ Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp I, Hà Nội.
2. Bùi Quý Huy. 1998. Một số đặc điểm bệnh tụ huyết trùng ở Việt Nam trong những năm qua, *Khoa học kỹ thuật thú y*, tập 5, số 1, Hội thú y Việt Nam.
3. Phan Thanh Phụng. 2000. Bệnh tụ huyết trùng gia súc, gia cầm và biện pháp phòng chống. *Tạp chí KHKT Thú y*, tập VII, số 2.

4. Đỗ Ngọc Thuý. 2007. Ứng dụng kỹ thuật PCR để định type giáp mô của các chủng vi khuẩn *P. multocida* phân lập được từ vật nuôi. *Tạp chí KHKT Thú y*. 14(1). tr. 36- 41.
5. Busch, C., Orth, J., Djouder, N. & Aktories, K. 2001. Biological Activity of a C-Terminal Fragment of *Pasteurella multocida* Toxin. *Infection and immunity*, 69, 3628-3634.
6. Freddy H., Frank P., Koen C., Dominiek M., Richard D., and Annemie D. 2004. "Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine": 2008. *Veterinary Microbiology* 100:255–268
7. García N., Fernández-Garayzábal J.F., Goyache J., Domínguez L. & Vela A.I. 2011. Associations between biovar and virulence factor genes in *Pasteurella multocida* isolates from pigs in Spain. *Vet. Rec.* 169:362-366.
8. Hussaini J., Abdullahi M.A., and Ismail S. 2012. Expression and immunogenicity determination of recombinant clone of *Pasteurella multocida* serotype B against Haemorrhagic septicaemia: Towards a vaccine development. *Journal of Animal and veterinary advances*. 11 (3): 351-356.
9. Hussaini J., Nazmul M.H.M., Abdullah M.A., and Ismail S. 2011. Recombinant clone ABA392 protects laboratory animals from *Pasteurella multocida* serotype B. *African Journal Microbiology Research*. 5:2596–2599.
10. Kim T.J., Lee J.I., and Lee B.J. 2006. Development of a toxA Gene Knock-out Mutant of *Pasteurella multocida* and evaluation of its protective effects. *Journal of Microbiology*. 44(3) 320-326.
11. Lee Jeongmin and Hee-Jong Woo. 2010. Antigenicity of Partial Fragments of Recombinant *Pasteurella multocida* Toxin. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(12): 1756–1763.
12. Lee K.E., Jeoung H.Y., Lee J.Y., Lee M.H., Choi H.W., Chang K.S., Oh Y.H., An D.J. 2012. Phenotypic characterization and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Pasteurella multocida* isolated from Korean Pigs. *Bacteriology*. 74(5): 567-573.
13. Liao C.M., Huang C., Hsuan S.L., Chen Z.W., Lee W.C., Liu C.I., Winton J.R., Chien M.S. 2006. Immunogenicity and efficacy of three recombinant subunit *Pasteurella multocida* toxin vaccines against progressive atrophic rhinitis in pigs. *Vaccine*. 9:24(1):27-35.
14. May B.J., Zhang Q., Li L.L., Paustian M.L., Whittam T.S., and Kapur V. 2001. Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*. Pm70" *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98 (6), pp.3460–3465.
15. Okay, S., Özcengiz, E., Gursel, I. & Özcengiz, G. 2012. Immunogenicity and protective efficacy of the recombinant *Pasteurella* lipoprotein E and outer membrane protein H from *Pasteurella multocida* A: 3 in mice. *Research in veterinary science*, 93, 1261-1265.
16. Qureshi, S., and Saxena, H.M. 2014. Estimation of titers of antibody against *Pasteurella multocida* in cattle vaccinated with haemorrhagic septicemia alum precipitated vaccine. *Veterinary World*. 7 (4). 224-228.

Ngày nhận 9-11-2018

Ngày phản biện 1-3-2019

Ngày đăng 1-7-2019