

TẠO DÒNG KHÁNG NGUYÊN FLIC CỦA EDWARDSIELLA ICTALURI KHẢM TRONG TIÊM MAO CỦA BACILLUS SUBTILIS

Huỳnh Xuân Yên*, Nguyễn Anh Minh*, Trần Cát Đông*, Vũ Thanh Thảo*

TÓM TẮT

Mở đầu: Những năm gần đây, bệnh gan thận mủ gây ra bởi vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* đã gây nhiều tổn thất nghiêm trọng về kinh tế cho các hộ nuôi cá tra ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long. Phòng ngừa bệnh bằng vaccin là một lựa chọn tốt hơn so với điều trị bằng kháng sinh. Protein fliC của *E. ictaluri* được quan tâm như một kháng nguyên tiềm năng. Đồng thời, *Bacillus subtilis* là một ứng viên trong việc làm giá mang kháng nguyên thế hệ mới.

Mục tiêu: Tạo dòng *B. subtilis* mang protein fliC của *E. ictaluri* khảm trong tiêm mao hướng đến ứng dụng làm vaccin phòng bệnh gan thận mủ ở cá tra.

Phương pháp: Trình tự mang tính kháng nguyên fliC được biểu hiện bởi chủng *Escherichia coli* BL21(DE3) để làm vaccin subunit đối chứng. Đồng thời, trình tự này cũng được sử dụng để tạo dòng *B. subtilis* mang protein kháng nguyên fliC khảm trong tiêm mao. Các chủng *B. subtilis* tái tổ hợp được kiểm tra về khả năng di động và biểu hiện tiêm mao.

Kết quả: Protein kháng nguyên fliC với kích thước khoảng 11 kDa được biểu hiện thành công nhờ chủng *E. coli* BL21(DE3). Nghiên cứu cũng tạo dòng thành công chủng *B. subtilis* mang kháng nguyên fliC khảm trong tiêm mao. Chủng *B. subtilis* này có khả năng di động và biểu hiện tiêm mao.

Kết luận: Chủng *B. subtilis* tái tổ hợp thu được thể hiện nhiều tiềm năng để phát triển thành một vaccin đường uống có khả năng sử dụng như một chế phẩm probiotic.

Từ khóa: *Edwardsiella ictaluri*, vaccin đường uống, protein fliC, protein hag.

ABSTRACT

CLONING OF MOSAIC FLIC ANTIGEN OF EDWARDSIELLA ICTALURI IN BACILLUS SUBTILIS FLAGELLA

Huynh Xuan Yen, Nguyen Anh Minh, Tran Cat Dong, Vu Thanh Thao

* Ho Chi Minh City Journal of Medicine * Supplement of Vol. 23 - No 2- 2019: 24 – 31

Background : Recently, catfish farming in the Mekong Delta of Vietnam has been challenging with a disease named "Enteric septicemia of catfish" (ESC). ESC is a highly fatal systemic infection caused by the bacterium *Edwardsiella ictaluri*. Vaccination is a better option than treatment. Protein fliC of *E. ictaluri* has been considered as a potential antigen. Moreover, *Bacillus subtilis* presents to be a new generation recombinant protein carrier.

Method: The predicted antigenic region of fliC is expressed by *Escherichia coli* BL21(DE3) to serve as control subunit vaccine. Moreover, this antigenic region is also used to clone *B. subtilis* with mosaic fliC antigen in its flagella. The recombinant strain is tested for its motility and capability to express its flagella.

Result: The antigenic region of fliC is successfully expressed by *E. coli* BL21(DE3) and is detected at the 11 kDa band on SDS-PAGE 18%. The research also succeeds in cloning a *B. subtilis* strain with mosaic fliC antigen in its flagella. The results show that this *B. subtilis* strain is motile and able to express its flagella.

*Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Tác giả liên lạc: TS. Vũ Thanh Thảo ĐT: 02838295641 – 127

Email: vuthanhthao@ump.edu.vn

Conclusion: *The recombinant B. subtilis strain is expected to use as an oral vaccine which can be easily used as a daily probiotics product.*

Key words: *Edwardsiella ictaluri, oral vaccine, protein fliC, protein hag*

MỞ ĐẦU

Bệnh gan thận mủ do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây ra trên cá da trơn, đặc biệt là cá tra thường xảy ra vào cuối xuân, đầu hạ, phát triển nhanh chóng, lây lan mạnh và có tỷ lệ chết cao gây thiệt hại nghiêm trọng cho các hộ nuôi cá tra ở Đồng bằng sông Cửu Long⁽²⁾. Cơ chế lây lan của bệnh là thông qua đường miệng, cá bệnh sẽ phát tán vi khuẩn ra môi trường qua phân và thải tác nhân gây bệnh ra ao, hồ⁽⁴⁾.

Hiện nay, cá mắc bệnh gan thận mủ được điều trị với florfenicol hoặc sulfadimethoxine/orometoprim⁽¹²⁾. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh chữa bệnh lâu dài dẫn đến hiện tượng kháng thuốc; đồng thời, những tồn lưu kháng sinh không mong muốn đã khiến cho việc xuất khẩu thủy sản gặp nhiều khó khăn. Trên thế giới, nhiều nghiên cứu về vaccin giúp phòng ngừa bệnh gan thận mủ đã được phát triển, chủ yếu là các vaccin vi khuẩn sống giảm độc lực và vaccin bất hoạt⁽⁹⁾. Tuy nhiên, việc sử dụng vaccin sống lại gây tranh cãi vì nguy cơ phát triển ngược thành dạng có độc lực. Vì vậy, cần thiết phải phát triển vaccin tái tổ hợp để tăng tính an toàn của biện pháp. Trong số các kháng nguyên của *E. ictaluri*, protein màng ngoài (Outer membrane protein - OMP), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), và protein tiêm mao được chứng minh có khả năng gây đáp ứng miễn dịch tốt, đây là các ứng viên tiềm năng trong việc tạo vaccin tái tổ hợp⁽⁸⁾. Protein tiêm mao là một kháng nguyên ứng viên với gen mã hóa cho protein đã được xác định (*fliC1*, *fliC2*, *fliC3* và *fliC4*)⁽⁷⁾. Nghiên cứu trước đây cũng cho thấy protein này gây kích thích miễn dịch tốt trên cá.

Việc chủng ngừa hiện nay được thực hiện bằng phương pháp tiêm hoặc ngâm trong huyền phù, tuy nhiên phương pháp tiêm gây

tổn kém về nhân lực còn phương pháp ngâm trong huyền phù chỉ ứng dụng được trên một số chủng vi sinh vật gây bệnh đơn giản⁽¹¹⁾. Chủng ngừa bằng đường uống trước đây ít được quan tâm vì các nhược điểm như: kháng nguyên hòa tan tạo ra phản ứng miễn dịch kém, có thể bị phân hủy trong dạ dày, hấp thu và dung nạp hạn chế. Để khắc phục các nhược điểm này, vaccin uống được gắn lên các giá mang như *Bacillus subtilis* - một vi khuẩn có khả năng tạo nội bào tử chống lại các điều kiện khắc nghiệt của môi trường⁽³⁾.

Các nghiên cứu trước đây thực hiện theo hướng neo kháng nguyên lên vỏ bào tử của *B. subtilis*, hay biểu hiện protein kháng nguyên dưới dạng tiết. Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu tiến hành khám protein kháng nguyên fliC của *E. ictaluri* vào tiêm mao của *B. subtilis*. Protein tiêm mao - flagella của *B. subtilis* được mã hóa bởi gen *hag*, cấu trúc bậc 3 của protein hag cho thấy vùng đầu N (acid amin 1-143) và đầu C (acid amin 218-304) sẽ gấp cuộn và là vùng nhận diện của thụ thể Toll-like Receptor 5 (TLR5) trên tế bào. Các trình tự acid amin ở giữa là vùng nhận biết của kháng thể, gây đáp ứng miễn dịch đặc hiệu qua trung gian tế bào lympho T, hình thành kháng thể có khả năng bảo vệ vật chủ khi phơi nhiễm với kháng nguyên⁽¹⁰⁾. Sự dung hợp giúp cho việc trình diện kháng nguyên fliC hiệu quả hơn thông qua thụ thể TLR5 và khả năng tạo nội bào tử của *B. subtilis* giúp cho quá trình sản xuất và bảo quản vaccin thuận lợi hơn.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng chủ và plasmid

Escherichia coli DH5 α được sử dụng làm chủng tạo dòng. *E. coli* BL21(DE3) và *B. subtilis* PY79 được sử dụng làm chủng biểu hiện. Plasmid pUC57.FNG chứa trình tự đã tối ưu hóa của gen *fliC* trong các nghiên cứu trước

của nhóm nghiên cứu. Plasmid pET28b(+) được sử dụng để tạo vector tái tổ hợp cho mục đích biểu hiện protein *fliC*. Plasmid pDG364 được sử dụng để chèn đoạn gen đích vào bộ gen của *B. subtilis*. Vi khuẩn và plasmid được cung cấp bởi PTN Công nghệ sinh học Dược, Khoa Dược, Đại học Y Dược TP.Hồ Chí Minh.

Tạo dòng *E. coli* BL21(DE3) mang vector tái tổ hợp pET28b(+).*fliC*

Gen *fliC* được thu nhận từ khuôn mẫu pUC57.FNG bằng phản ứng PCR với cặp mồi tương ứng (Bảng 1). Gen *fliC* và vector pET28b(+) được xử lý với cặp enzym *Bam*HI/*Hind*III, nối lại bằng T4 DNA Ligase và biến nạp vào *E. coli* DH5α. Chúng tái tổ hợp được sàng lọc bằng phản ứng PCR. Vector pET28b(+).*fliC* được biến nạp vào *E. coli* BL21(DE3) và sàng lọc chúng tái tổ hợp bằng PCR với cặp mồi exp_ *fliC*_F/exp_ *fliC*_R.

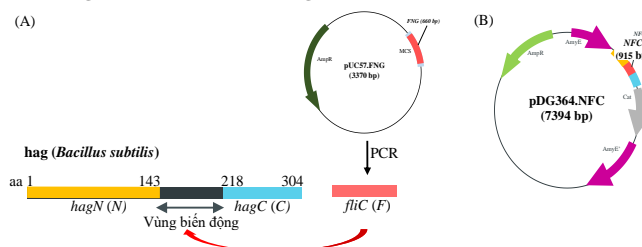
Cảm ứng biểu hiện và tinh sạch protein *fliC* tái tổ hợp

Chúng *E. coli* BL21(DE3)/pET28b(+).*fliC* được tăng sinh trong 100 ml LB và cảm ứng biểu hiện với IPTG 1 mM trong 16 giờ ở 25 °C. Ly tâm thu cần ở 10.000 g/5 phút. Ly giải cần vi khuẩn bằng tán siêu âm 30 giây/chu kỳ (5 chu kỳ). Ly tâm 10.000 g/5 phút thu protein ở các pha tổng, tan và tủa. Thực hiện đồng thời với mẫu đối chứng âm không cảm ứng IPTG. Sau khi xác định protein *fliC* hiện diện trong pha nào, tinh chế protein đích bằng sắc ký ái lực với cột Ni-Sepharose (GE Healthcare), thu nhận bằng đệm thôi có nồng độ Imidazol 100 mM và thẩm tách loại muối qua màng MCO 6000-8000 kDa (Sigma) trong đệm PBS trong

16 giờ ở 4 °C. Protein tái tổ hợp được kiểm tra biểu hiện bằng phương pháp SDS-PAGE với thuốc nhuộm Coomassive Blue và Western Blot với kháng thể anti-His tag (Sigma). Protein *fliC* tinh chế để phục vụ cho giai đoạn tạo kháng thể anti-*fliC* IgG.

Tạo dòng *B. subtilis* mang protein *fliC* khả năng trong tiêm mao

Gen *fliC* được thu nhận từ khuôn mẫu pUC57.FNG, gen *hagN* và *hagC* được thu nhận từ khuôn mẫu DNA nhiễm sắc thể (NST) *B. subtilis* PY79 (Hình 1) bằng phản ứng PCR với cặp mồi tương ứng (Bảng 1). Các gen *hagN*, *fliC* và *hagC* được chèn vào vector pET28b(+) đã được xử lý với enzym *Bam*HI/*Hind*III bằng phương pháp GoldenGate Assembly. Thu nhận trình tự NFC bằng phản ứng PCR trên khuôn mẫu pET28b(+).NFC với cặp mồi *hagN*_F/*hagC*_R, xử lý NFC với enzym *Bsa*I, nối vào vector pDG364 đã được xử lý với *Bam*HI/*Hind*III bằng T4 DNA Ligase và biến nạp vào *E. coli* DH5α. Chúng tái tổ hợp được sàng lọc bằng PCR khuẩn lạc và kiểm tra lại bằng phản ứng cắt plasmid với *Hind*III. Vector pDG364.NFC được duỗi thẳng bằng *Xho*I và biến nạp vào *B. subtilis*. Chúng tái tổ hợp được sàng lọc bằng PCR với mồi *hagN*_F/*hag*_FliC_R trên khuôn mẫu DNA NST và kiểm tra khả năng thủy giải tinh bột trên môi trường thạch LB (bổ sung 1% tinh bột) để chứng minh vector pDG364.NFC đã được tái tổ hợp vào locus *amyE* của *B. subtilis*.



Hình 1: Thiết kế trình tự NFC (A): cặp độ phân tử, (B): Vector pDG364.NFC

Bảng 1: Danh sách môi sử dụng trong nghiên cứu

Gen mục tiêu	Tên	Trình tự 5'-3'	Kích thước
<i>exp_fliC</i>	exp_FliC_F	GCTTGGATCCGacaggctctttggaactg	200 bp
	exp_FliC_R	CTCCAAGCTTTCAatctgccgcaacagtaac	
<i>hagN (N)</i>	hagN_F	GGTCTCGGATCtgcagcagcggtatccagc	685 bp
	hagN_RGG	GAAGATCTGGAAGCGGTCTCTCAGtgcaggagtagctgtgtc	
<i>fliC (F)</i>	hag_FliC_F	CTGTGGTCTCAACTGacaggctctttggaactg	200 bp
	hag_FliC_R	CAGTGGTCTCACAGCatctgccgcaacagtaac	
<i>hagC (C)</i>	hagC_FGG	GAAGATCTGGTCTGTGGTCTCAgctgatatcggttcgat	350 bp
	hagC_R	GGTCTCAAGCTcctggcaacgccaaggtc	

Chú thích: chữ thường: trình tự bắt cặp với DNA khuôn mẫu, chữ hoa: trình tự thêm vào đầu 5', gạch dưới: trình tự nhận diện của enzym cắt giới hạn, môi do IDT tổng hợp.

Kiểm tra sự biểu hiện tiềm mao của chủng *B. subtilis* tái tổ hợp

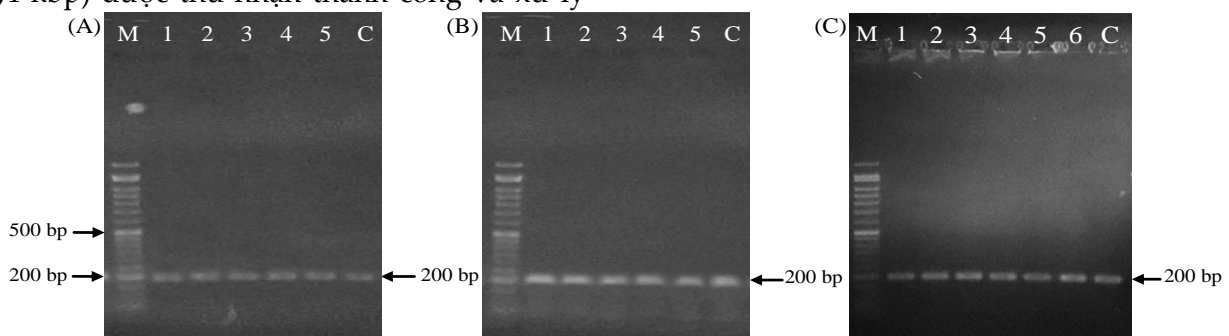
Chủng *B. subtilis* tái tổ hợp được kiểm tra khả năng di động trên thạch LB bán rắn (0,4% agar) và biểu hiện của tiềm mao bằng Western Blot⁽⁶⁾ với kháng thể anti-hag IgG (kháng thể kháng protein tiềm mao hag của *B. subtilis* do nhóm nghiên cứu tạo ra).

KẾT QUẢ

Tạo dòng *E. coli* BL21(DE3) mang vector tái tổ hợp pET28b(+).*exp_fliC*

Gen *exp_fliC* (200 bp) và vector pET28b(+) (5,4 kbp) được thu nhận thành công và xử lý

với enzym *Bam*HI/*Hind*III. Hỗn hợp nối được biến nạp vào *E. coli* DH5α và thu nhận được 5 khuẩn lạc tiềm năng bằng PCR khuẩn lạc với cặp môi *exp_fliC_F/exp_fliC_R* (giếng 1-5, Hình 2A). Plasmid chiết được từ 5 chủng này được kiểm tra lại bằng PCR với cặp môi *exp_fliC_F/exp_fliC_R*. Kết quả PCR (giếng 1-5, Hình 2B) đều cho bằng DNA đúng kích thước của gen *exp_fliC* (200 bp). Như vậy, 5 chủng *E. coli* DH5α mang vector pET28b(+).*exp_fliC* đã được tạo dòng thành công, ký hiệu các chủng từ HY007-HY011.



Hình 2: (A): Sản phẩm PCR khuẩn lạc sàng lọc chủng mang vector pET28b(+).*exp_fliC*, (B): Sản phẩm PCR với các plasmid chiết từ các khuẩn lạc tiềm năng, (C): Sản phẩm PCR kiểm tra chủng *E. coli* BL21(DE3) mang vector tái tổ hợp pET28b(+).*exp_fliC*.

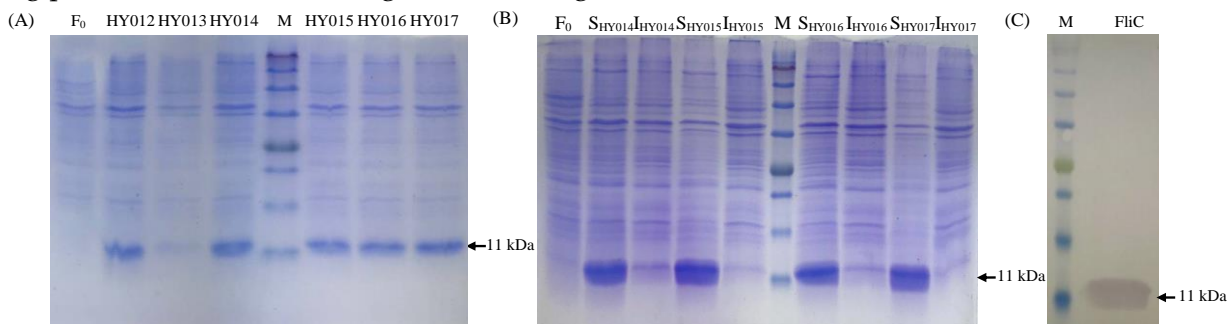
Plasmid pHY010 chiết từ chủng *E. coli* HY010 được chọn để biến nạp vào *E. coli* BL21(DE3). 6 khuẩn lạc mọc trên LBAK30 được lựa chọn ngẫu nhiên để chiết plasmid và kiểm tra bằng PCR với cặp môi đặc hiệu. Kết quả PCR (giếng 1-6, Hình 2C) đều cho

bằng tương ứng với bằng DNA của chủng dương pUC57.FNG (giếng C, Hình 2C) và đúng kích thước của gen *exp_fliC* (200 bp). Như vậy, 6 chủng *E. coli* BL21(DE3) mang vector pET28b(+).*exp_fliC* đã được tạo dòng thành công, ký hiệu chủng là HY012-HY017.

Kiểm tra biểu hiện và tinh sạch protein fliC tái tổ hợp

Kết quả biểu hiện protein fliC bởi 6 chủng HY012-HY017 được kiểm tra trên gel SDS-PAGE 18% cho thấy mẫu protein pha tổng ở các chủng có cảm ứng IPTG đều xuất hiện băng protein kích thước khoảng 11 kDa, tương

ứng với kích thước protein fliC (10,5 kDa) dự đoán và không thấy sự xuất hiện của băng protein này ở chứng âm (Hình 3A). Mặt khác, 4 chủng biểu hiện mạnh HY014-HY017 được chọn để phân tích protein pha tan và pha tủa, nhận thấy mẫu protein nằm ở pha tan (Hình 3B).



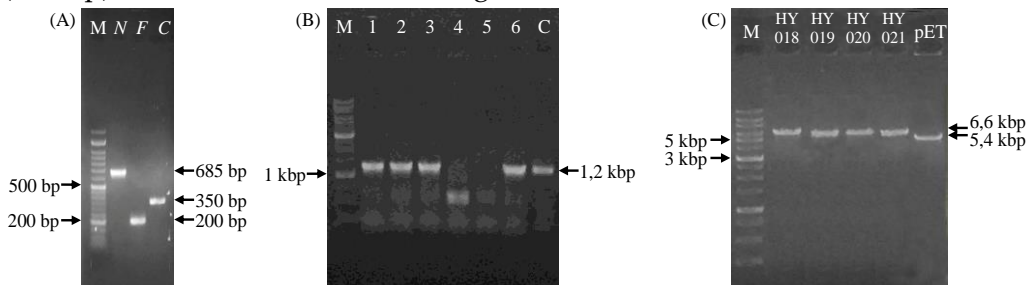
Hình 3: (A): Phân tích biểu hiện protein fliC ở các chủng *E. coli* BL21(DE3) tái tổ hợp, (B): Phân tích biểu hiện xác định trạng thái của protein fliC, (C): Kết quả Western Blot với kháng thể anti-his tag. M: protein marker Opti-XL, F₀: chủng không cảm ứng IPTG, S: pha tan, I: pha tủa.

Chủng HY014 được lựa chọn cảm ứng biểu hiện với thể tích 100 ml, dịch ly giải mẫu được xử lý theo quy trình của protein pha tan và tinh chế qua cột Ni-Sepharose. Mẫu protein sau khi thẩm tích được xác định nồng độ bằng phương pháp Bradford. Nồng độ protein thu được 250 µg/ml. Kết quả kiểm tra bằng Western Blot với kháng thể anti-His tag dương tính ở vị trí 11kDa (Hình 3C), cho thấy protein biểu hiện ở vị trí 11 kDa có đuôi his-tag và là protein fliC mong muốn.

Tạo dòng *B. subtilis* mang protein fliC khả trong tiêm mao

Gen *hagN* (N) (685 bp), *fliC* (F) (200 bp) và *hagC* (C) (350 bp) được thu nhận thành công

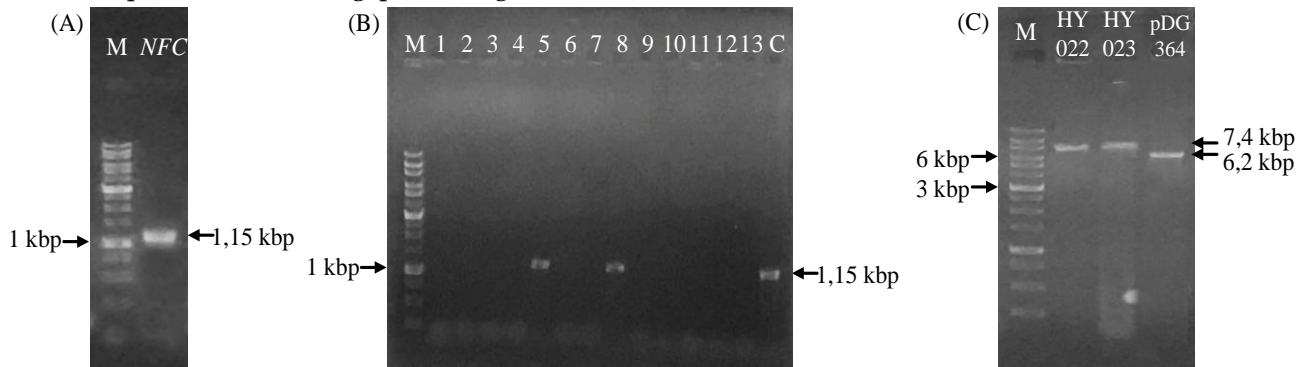
bằng phản ứng PCR (Hình 4A). Hỗn hợp nối của N, F, C và pET28b(+) đã được xử lý với *Bam*HI/*Hind*III được biến nạp vào *E. coli* DH5α và thu nhận được 4 khuẩn lạc tiềm năng bằng phương pháp PCR khuẩn lạc với cặp mồi *hagN*_F/*hagC*_R (giếng 1-3 và 6, Hình 4B), 2 khuẩn lạc ở giếng 4 và 5 (Hình 4B) không có đoạn chèn. Kết quả kiểm tra bằng phản ứng cắt với *Bam*HI cho thấy plasmid mở vòng của 4 khuẩn lạc này có băng DNA kích thước khoảng 6,6 kbp và lớn hơn kích thước của vector pET28b(+) (Hình 4C). Như vậy, 4 chủng *E. coli* mang vector pET28b(+).NFC đã được tạo dòng thành công, ký hiệu các chủng từ HY018-HY021.



Hình 4: (A): Thu nhận gen *hagN* (N), *fliC* (F) và *hagC* (C), (B): Sản phẩm PCR khuẩn lạc sàng lọc chủng mang pET28b(+).NFC, C: sản phẩm PCR chứng dương DNA NST *B. subtilis* PY79, (C): Kết quả cắt kiểm tra các plasmid pET28b(+).NFC với *Bam*HI.

Gen *NFC* (1,2 kbp) được thu nhận thành công bằng PCR trên khuôn mẫu pHY018 (Hình 5A). Hỗn hợp nối giữa *NFC* và pDG364 được biến nạp vào *E. coli* DH5 α , thu nhận được 2 chủng tiềm năng bằng PCR khuôn lạc với mỗi hagN_F/hagC_R (giếng 1-13) (Hình 5B). Kết quả kiểm tra bằng phản ứng cắt với

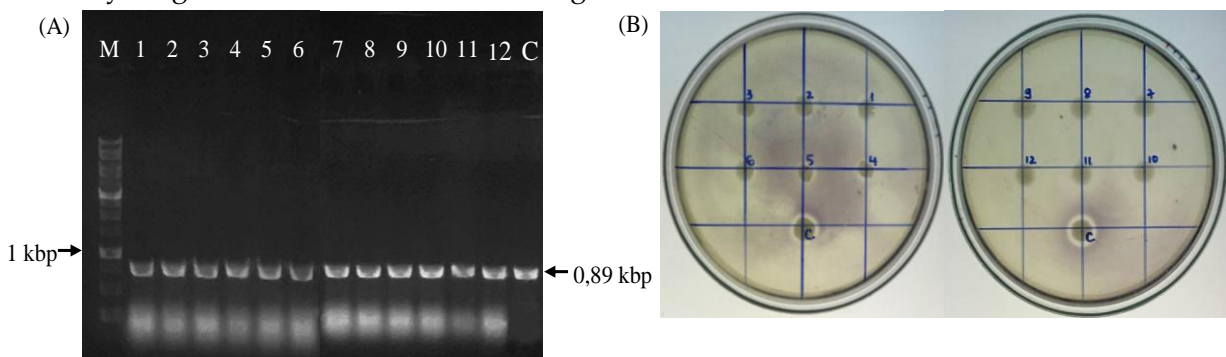
*Hind*III cho thấy plasmid mở vòng của 2 khuẩn lạc này có kích thước khoảng 7,4 kbp và lớn hơn kích thước của pDG364 (6,2 kbp) (Hình 5C). Vậy, 2 chủng *E. coli* DH5 α mang vector pDG364.NFC đã được tạo dòng thành công, ký hiệu chúng là HY022 và HY023.



Hình 5: (A): Thu nhận gen *NFC*, (B): Sản phẩm PCR khuẩn lạc sàng lọc chủng mang pDG364.NFC, C: sản phẩm PCR chứng dương DNA NST *B. subtilis* PY79, (C): Kết quả cắt kiểm tra plasmid chiết được với *Hind*III

Plasmid pHY022 và pHY023 được gửi giải trình tự ở công ty PhuSa Biochem. Kết quả pHY022 ghi nhận 3 đột biến điểm tuy nhiên không làm thay đổi trình tự acid amin; pHY023 không có đột biến. Do đó, tiếp tục tiến hành chuyển gen *NFC* vào *B. subtilis* bằng

plasmid pHY023. pHY023 được biến nạp vào *B. subtilis*, lựa chọn ngẫu nhiên 12 khuẩn lạc mọc trên LBAC5 tăng sinh chiết DNA NST để kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mồi hagN_F/hag_FliC_R.

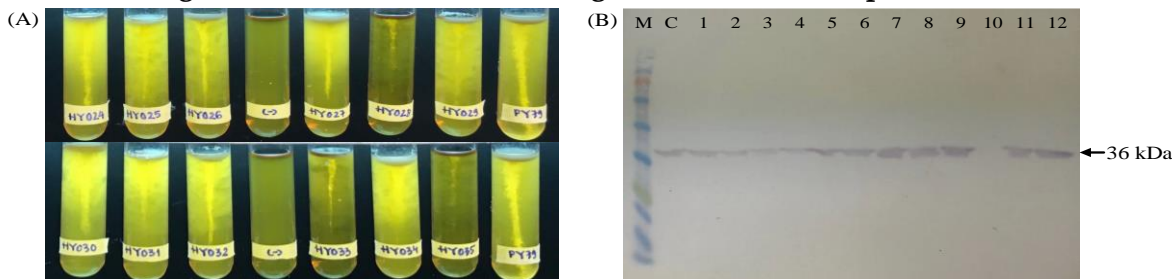


Hình 6: (A): Sản phẩm PCR sàng lọc chủng *B. subtilis* mang trình tự *NFC*, (B): Kết quả kiểm tra khả năng thủy giải tinh bột của 12 chủng *B. subtilis* tái tổ hợp, C: *B. subtilis* PY79 WT

Kết quả cho thấy 12 khuẩn lạc thu nhận đều cho sản phẩm PCR có kích thước khoảng 0,89 kbp và tương đương với chứng dương là sản phẩm PCR từ khuôn mẫu pHY023 chiết từ chủng (Hình 6A). 12 khuẩn lạc tiềm năng

đồng thời cũng mất khả năng thủy giải tinh bột vì được chèn vào locus *amyE* của *B. subtilis* (Hình 6B). Như vậy, 12 chủng *B. subtilis* tái tổ hợp đã được tạo dòng thành công, ký hiệu chúng là HY024-HY035.

Kiểm tra khả năng biểu hiện tiêm mao của chủng *B. subtilis* tái tổ hợp



Hình 7: (A): Kết quả kiểm tra di động trên thạch bán rắn các chủng HY024-HY035, (B): Kết quả Western Blot với kháng thể anti-hag IgG dịch chiết flagella các chủng HY024-HY035.

Kết quả kiểm tra di động (Hình 7A) cho thấy các chủng đều di động, tuy nhiên chủng HY028, HY033 và HY035 ghi nhận sự di động yếu hơn so với chủng hoang dại.

Đồng thời kết quả Western Blot tiêm mao chiết được với kháng thể anti-hag IgG (Hình 7B) cho thấy các chủng có khả năng biểu hiện tiêm mao, tuy nhiên mức độ biểu hiện cũng có sự khác biệt so với chủng *B. subtilis* PY79 hoang dại (giếng C, Hình 7B), trong đó chủng HY025-HY027, HY033 (giếng 2-4 và giếng 10, Hình 7B) biểu hiện yếu hơn, các chủng HY030-HY032, HY034, HY035 (giếng 7-9, giếng 11,12, Hình 7B) biểu hiện mạnh hơn và các chủng còn lại có mức độ biểu hiện tương đương.

BÀN LUẬN

Trên thế giới đã có nhiều báo cáo cho thấy tiêm mao là yếu tố gây độc của nhiều loài vi khuẩn gây bệnh ở cá như *Vibrio anguillarum*, *V. fischeri*, *Aeromonas hydrophila*, *E. tarda*. Cụ thể, Jiao đã tạo thành công vaccin từ *fliC* của *E. tarda* dưới dạng protein tái tổ hợp và vaccin DNA, trong đó dạng vaccin DNA của kháng nguyên Eta6 hoặc Et18 kết hợp với *fliC* cho hiệu quả cao nhất⁽⁵⁾. Tuy nhiên, hiện vẫn chưa có nghiên cứu nào về vaccin tái tổ hợp từ protein *fliC* của *E. ictaluri*.

Protein hag của *B. subtilis* là một protein được biểu hiện nhiều nhất trong tế bào và

không phải protein thiết yếu nên những biến đổi di truyền không làm ảnh hưởng đến sự sống của vi khuẩn⁽¹⁾. Điều này được thể hiện qua kết quả của đề tài khi đã tạo dòng thành công chủng *B. subtilis* mang protein *fliC* dung hợp trong tiêm mao mà vẫn biểu hiện tiêm mao và di động bình thường. Protein tiêm mao *fliC* của *E. ictaluri* được sử dụng làm kháng nguyên, dung hợp vào protein hag của *B. subtilis*. Khi đó, *B. subtilis* trở thành giá mang kháng nguyên. Vi khuẩn này sẽ được lên men và thu nhận ở dạng bào tử. Khi sử dụng, vaccin là bào tử *B. subtilis* được trộn với thức ăn và chủng ngừa bằng cách cho cá ăn, bào tử sau đó sẽ nảy mầm khi vào môi trường nước hoặc ruột cá và sẽ biểu hiện kháng nguyên protein tiêm mao của *E. ictaluri* gây ra những đáp ứng miễn dịch đặc hiệu, bảo vệ đàn cá trước tác nhân gây bệnh.

KẾT LUẬN

Protein *fliC* có kích thước 11 kDa đã được biểu hiện và tinh chế thành công với lượng 1,5 mg để phục vụ cho giai đoạn tạo kháng thể anti-*fliC* IgG. Đồng thời, nghiên cứu thu nhận được 12 chủng *B. subtilis* tái tổ hợp mang protein *fliC* khảm trong tiêm mao làm tiền đề cho thử nghiệm hiệu quả phòng ngừa bệnh gan thận mũ trên mô hình *in vivo*.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này sử dụng kinh phí của đề tài số 240/2017/HĐ-SKHCN do Sở Khoa học và Công nghệ TP. Hồ Chí Minh cấp cho Vũ Thanh Thảo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Commichau FM, Pietack N, Stulke J (2013), "Essential genes in *Bacillus subtilis*: a re-evaluation after ten years", *Mol Biosyst.* 9(6), pp.1068-1075.
2. Crumlish M, Dung TT, Turnbull JF, et al. (2002), "Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam", *Journal of Fish Diseases.* 25(12), pp.733-736.
3. Cutting SM (2011), "*Bacillus probiotics*", *Food Microbiol.* 28(2), pp.214-220.
4. Hawke JP (2015), "Enteric Septicemia of Catfish". SRAC Publication No. 477. Southern Regional Aquaculture Center, MSU, Mississippi, United States of America. 6p.
5. Jiao XD, Zhang M, Hu YH, et al. (2009), "Construction and evaluation of DNA vaccines encoding *Edwardsiella tarda* antigens", *Vaccine.* 27(38), pp.5195-5202.
6. Mukherjee S, Babitzke P, Kearns DB (2013), "*FliW* and *FliS* function independently to control cytoplasmic flagellin levels in *Bacillus subtilis*", *J Bacteriol.* 195(2), pp.297-306.
7. Panangala VS, Russo R, Santen VLV, et al. (2009), "Organization and sequence of four flagellin-encoding genes of *Edwardsiella ictaluri*", *Aquaculture Research.* 40(10), pp.1135-1147.
8. Park SB, Jang HB, Nho SW, et al. (2011), "Outer membrane vesicles as a candidate vaccine against edwardsiellosis", *PLoS One.* 6(3), e17629.
9. Pridgeon JW, Klesius PH (2011), "Development of a novobiocin-resistant *Edwardsiella ictaluri* as a novel vaccine in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)", *Vaccine.* 29(34), pp.5631-5637.
10. Smith K., Andersen-Nissen E, Hayashi F, et al. (2003), "Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility", *Nat Immunol.* 4(12), pp.1247-1253.
11. Sommerset I, Krossoy B, Biering E, et al. (2005), "Vaccines for fish in aquaculture", *Expert Rev Vaccines.* 4(1), pp.89-101.
12. Tu TD, Haesebrouck F, Nguyen AT, et al. (2008), "Antimicrobial susceptibility pattern of *Edwardsiella ictaluri* isolates from natural outbreaks of bacillary necrosis of *Pangasianodon hypophthalmus* in Vietnam", *Microb Drug Resist.* 14(4), pp.311-316.

Ngày nhận bài báo: 18/10/2018

Ngày phản biện nhận xét bài báo: 01/11/2018

Ngày bài báo được đăng: 15/03/2019