

XÁC ĐỊNH TỶ LỆ NHIỄM *STREPTOCOCCUS SUIS* TYPE 2 Ở LỢN GIẾT MỔ TRÊN ĐỊA BÀN THÀNH PHỐ HUẾ VÀ TẠO DÒNG, BIỂU HIỆN GENE MÃ HÓA 6-PHOSPHOGLUCONATE-DEHYDROGENASE PROTEIN TRONG *E. COLI*/BL21

Lê Quốc Việt¹, Hoàng Thị Thùy Nhung¹, Đinh Thị Bích Liên¹, Đặng Thanh Long¹, Huỳnh Văn Chương¹, Lê Công Thịnh¹, Phùng Thăng Long², Nguyễn Xuân Hòa²

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật PCR để phát hiện *Streptococcus suis* (*S. suis*) type 2 trong 100 mẫu dịch mũi của lợn. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ nhiễm *S. suis* type 2 ở lợn giết mổ trên địa bàn thành phố Huế là 9%. Từ những mẫu phân tích bằng kỹ thuật PCR cho kết quả dương tính với *S. suis* type 2, chúng tôi đã phân lập vi khuẩn thuần, tạo dòng và biểu hiện gene mã hóa kháng nguyên bề mặt 6-phosphogluconate-dehydrogenase (6PGD) của vi khuẩn *S. suis* type 2 trong *E. coli* BL21 (DE3). Gene mã hóa kháng nguyên 6PGD phân lập được có độ dài 1428 bp, mã hóa chuỗi polypeptide chứa 475 amino acid, tương đồng 99% so với gene 6PGD được công bố trên GeneBank (mã số: gb|CP000407.1). Kết quả phân tích điện di SDS cho thấy protein dung hợp 6PGD-GST biểu hiện bởi tế bào *E. coli* BL21 (DE3) có khối lượng phân tử khoảng 76 kDa.

Từ khóa: lợn, *Streptococcus suis* type 2, protein 6PGD, kháng nguyên, TP. Huế

Determination of prevalence of *Streptococcus suis* type 2 in slaughtered pigs in Hue city and cloning, expression of gene encoding 6-phosphogluconate-dehydrogenase protein in *E. coli* BL 21

Le Quoc Viet, Hoang Thi Thuy Nhung, Dinh Thi Bich Lan, Dang Thanh Long, Huynh Van Chuong, Le Cong Thinh, Phung Thang Long, Nguyen Xuan Hoa.

SUMMARY

In this study, 100 pig nasal swab samples were examined by PCR technique for detection of *Streptococcus suis* type 2. The studied result indicated that the prevalence of *S. suis* type 2 in the slaughtered pigs in Hue city was 9%. From the positive samples with *S. suis* type 2 through PCR technique, the bacterial strain was isolated, the gene encoding 6-phosphogluconate-dehydrogenase (6PGD) protein of this bacteria was cloned and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The length of gene encoding 6PGD protein of *S. suis* type 2 was 1428 bp, this gene encoding a polypeptide chain contained 475 amino acid. Similarity level of the cloned 6PGD gene in comparison with 6PGD gene of Genebank (code: gb|CP000407.1) was 99%. The result of SDS electrophoresis showed that expression of the 6PGD gene in *E. coli* BL21 (DE3) produced a fusion protein having molecule weigh of ~76 kDa.

Keywords: pig, *Streptococcus suis* type 2, protein 6PGD, antigene, Hue city

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Streptococcus suis type 2 (liên cầu khuẩn lợn

type 2) là vi khuẩn gây bệnh chung cho người và lợn [5]. Tại Việt Nam, đã có nhiều người phải nhập viện do nhiễm liên cầu khuẩn. Ở lợn, *S. suis* type 2 gây viêm màng não, nhiễm khuẩn huyết, viêm phổi, viêm nội tâm mạc và viêm khớp [10].

¹ Viện công nghệ sinh học - Đại học Huế

² Trường đại học Nông Lâm - Đại học Huế

Thông thường, người bị nhiễm vi khuẩn là do tiếp xúc trực tiếp với lợn bệnh, lợn chết hoặc ăn tiết canh lợn, thịt lợn bệnh, lợn chết chưa được nấu chín kỹ [9].

Ở người, *S. suis* type 2 gây ra nhiễm trùng toàn thân, tổn hại đến nhiều cơ quan của cơ thể. Vi khuẩn thường gây viêm màng não với các triệu chứng như sốt cao, mệt, đau mũi người; đau đầu, ói mửa [3]. Những trường hợp nhiễm khuẩn huyết có thể xuất huyết dưới da, ban xuất huyết hoại tử lan rộng ở mặt, ngực, chân, tay và đầu các chi [7]. Để xác định tỷ lệ nhiễm liên cầu khuẩn ở lợn, chúng tôi đã sử dụng phản ứng PCR để kiểm tra 100 mẫu dịch mũi thu thập từ lợn được mang đến giết mổ trên địa bàn Thành phố Huế.

Theo Chen Tan và cộng sự (2008), protein 6-phosphogluconate-dehydrogenase (6PGD) là một protein bề mặt của liên cầu khuẩn có chức năng giúp vi khuẩn bám vào tế bào vật chủ và có khả năng kích thích gây đáp ứng miễn dịch [4]. Vì vậy, chúng tôi đã nghiên cứu nhằm sản xuất protein tái tổ hợp 6 PGD làm nguyên liệu cho các nghiên cứu, phát triển chế phẩm sinh học dùng trong phòng, trị bệnh do liên cầu khuẩn type 2 gây ra ở lợn.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

+ Dịch mũi lợn được lấy tại 3 lò mổ trên địa bàn Thành phố Huế.

+ Vector pGem[®]-T easy (Promega), vector pGEX-4T-3, chủng *E. coli* TOP10, BL21(DE3), kit Wizard[®]SV Gel and PCR CleanUp System (Promega).

+ Một số hóa chất thí nghiệm khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *S. suis* type 2 ở lợn

+ Phương pháp thu thập mẫu và tách ADN

Mẫu dịch mũi lợn được thu thập bằng cách lấy tăm bông vô trùng ngoáy sâu vào mũi và cho mẫu vào 5 ml môi trường BHI.

Ủ mẫu trong tủ ấm CO₂ 5% ở 37°C trong 16

giờ. Hút 700 µl dịch nuôi cấy để bảo quản (phục vụ cho quá trình phân lập vi khuẩn thuần), phần còn lại được ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút để thu cặn. Sau đó giết vi khuẩn bằng cách ủ cặn thu được ở 100°C trong 10 phút. ADN vi khuẩn được tách bằng cách tái huyền phù cặn vi khuẩn trong hỗn hợp gồm 250 µl dung dịch 1 (10 mM Tris HCl (pH 8.3), 100 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂) và 250 µl dung dịch 2 (10 mM Tris HCl (pH 8.3), 2,5 mM MgCl₂, 1% Tween 20, 1% Triton X-100, 0,01% nonidet P-10) và proteinase K (120 µg/ml), ủ ở 60°C trong 1 giờ, bất hoạt proteinase K ở 95°C trong 10 phút, sau đó để trở về nhiệt độ phòng. Tinh sạch ADN bằng dung dịch phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25/24/1), rửa với 50 µl 3M sodium acetate (pH 5.5) và 400 µl isopropanol trong 30 phút ở 4°C. Rửa lại bằng 400µl ethanol 70% và để ở nhiệt độ phòng [8].

+ Phương pháp PCR

Xác định mẫu dương tính với *S. suis* type 2 bằng phương pháp PCR với cặp primers chi thị CPS2J, sản phẩm PCR sẽ có kích thước khoảng 459 bp [8].

primer CPS2JF: GTTGAGTCCTTATACACCTGTT

primer CPS2JR: CAGAAAATTCATATTGTCCACC

Thành phần PCR bao gồm 2µl DNA, 12,5µl 2x Gotaq green master mix (Promega), 10 pmol mỗi primer và bổ sung nước cất vô trùng đạt thể tích cuối cùng là 25µl. PCR được thực hiện trong máy luân nhiệt (iCycler, Bio-Rad) theo quy trình sau: biến tính genome 95°C/5 phút; tiếp đến là 35 chu kỳ: 95°C/60 giây, 48°C/45 giây và 72°C/60 giây; cuối cùng là 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di agarose gel, quan sát và chụp ảnh kết quả điện di sản phẩm PCR bằng máy chụp ảnh gel.

2.2.2. Tạo dòng và biểu hiện gene mã hóa kháng nguyên 6PGD của *S. suis* type 2

+ Phân lập vi khuẩn *S. suis* type 2 thuần

Mẫu dịch mũi lợn đã được xác định dương tính với *S. suis* type 2 bằng phương pháp PCR được ria cấy trên môi trường thạch máu cừu 5%, nuôi 16 giờ trong tủ ấm CO₂ 5% ở 37°C. Sau khi nuôi, chọn ngẫu nhiên khuẩn lạc đơn có hình dạng tròn lồi, khô, màu xám, nhỏ đặc trưng của *Streptococcus spp* để kiểm tra bằng thử nghiệm bile esculin [2].

Khuẩn lạc dương tính với thử nghiệm bile esculin được sử dụng để tách ADN và tiến hành PCR để khẳng định là *S. suis* type 2.

+ Phương pháp PCR nhân đoạn gen kháng nguyên

Để phân lập đoạn gene mã hóa protein 6PGD, primers được thiết kế với enzyme giới hạn Bam HI ở primer 6PGD F và Sal I ở primer 6PGD R [4].

Primer 6PGD F: 5-GCG GAT CCA TGA CTA AAG CAA ATT TTG-3

Primer 6PGD R: 5-CCG TCG ACC TAT TTT GAT TCG CTA TAC-3

Với cặp mồi được thiết kế ở trên, đoạn ADN cần nhân lên có độ dài khoảng 1428 bp.

Thành phần PCR bao gồm 2µl DNA, 12,5µl 2x Gotaq green master mix (Promega), 10 pmol mỗi primer và bổ sung nước cất vô trùng đạt thể tích cuối cùng là 25µl. PCR được thực hiện trong máy luân nhiệt (iCycler, Bio-Rad) theo quy trình sau: biến tính genome 95°C/5 phút; tiếp đến là 35 chu kỳ: 95°C/60 giây, 55°C/45 giây và 72°C/60 giây; cuối cùng là 72°C/10 phút.

+ Tạo dòng gene

Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch bằng kit Wizard®SV Gel và PCR CleanUp System (Promega) được tạo dòng trong vector pGEM®-T Easy (Promega), thành phần phản ứng gắn bao gồm: 50 ng vector pGEM®-T Easy, 5 µl đệm, 1 đơn vị T4 DNA ligase, sản phẩm PCR, sau đó bổ sung nước cất vô trùng để đạt thể tích cuối cùng 10 µl, phản ứng được ủ 16°C trong 16 giờ. Dung dịch gắn được biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10 bằng phương pháp sốc nhiệt, thể biến nạp được chọn lọc bằng phương pháp khuẩn lạc xanh - trắng và kiểm tra bằng kỹ thuật PCR với các cặp mồi đặc hiệu cho gene 6PGD và với cặp mồi M13 (M13F: 5'-GTTTCCCAGTCACGAC-3' và M13R: 5' CAGGAAACAGCTATGAC-3') được thiết kế sẵn trên vector pGEM®-T Easy.[1].

ADN plasmid tái tổ hợp sau khi được tách chiết bằng PureLink® Quick Plasmid DNA Miniprep Kits (promega) được gửi đi phân tích trình tự nucleotide của gene 6PGD ở Công ty 1st

BASE, Malaysia thông qua Công ty TNHH phát triển Công nghệ ứng dụng Việt Nam VNDAT bằng phương pháp dideoxy terminator. Kết quả giải trình tự gene được phân tích bằng phần mềm BioEdit và so sánh mức độ tương đồng với trình tự đã được công bố trên ngân hàng gene NCBI.

+ Biểu hiện gene trong vector pGEX-4T-3

Tiến hành cắt giới hạn plasmid pGEM®-T Easy-6PGD và plasmid pGEX-4T-3 với enzyme giới hạn BamHI và SalI. Gắn đoạn gene 6PGD đã cắt vào vector pGEX-4T-3. Thành phần phản ứng gắn bao gồm: 25 ng vector pGEX-4T-3, 5 µl đệm, 1 đơn vị T4 DNA ligase, 25 ng sản phẩm DNA cắt giới hạn, sau đó bổ sung nước cất vô trùng để đạt thể tích cuối cùng 10 µl. Trộn nhẹ và ủ ở 16°C trong 16 giờ. Tiếp theo, phản ứng gắn được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt, thành phần bao gồm: 3 µl phản ứng gắn, 50 µl tế bào *E. coli* và 250 µl môi trường LB.

Sản phẩm biến nạp được cấy trải trên đĩa petri chứa môi trường LB đặc (1% tryptone; 0,5% dịch chiết nấm men; và 1% NaCl; 1,5% agar, pH 7) có bổ sung 50 µg/ml ampicillin và ủ ở 37°C qua đêm. Kiểm tra sự có mặt của gene 6PGD trong tế bào *E. coli* bằng PCR.

Các tế bào *E. coli* BL21(DE3) có vector biểu hiện mang gene PGD được nuôi trong bình tam giác chứa 50 ml môi trường LB lỏng và 50 µg/ml ampicillin ở 37°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Khi mật độ tế bào của dịch nuôi cấy đạt tới (OD_{600}) 0,8 thì bổ sung IPTG (1 mM/ml) và nuôi tiếp ở 25°C trong vòng 3 giờ. Sinh khối tế bào được thu nhận bằng cách ly tâm 6.000 vòng/phút trong 10 phút. Tách chiết protein tổng số nội bào bằng đệm TNE (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA) có bổ sung thêm lysozyme và 1% Triton X100 [1].

Protein 6PGD được kiểm tra bằng điện di polyacrylamide gel 15% có SDS ở 60 V, gel được nhuộm với Coomassie Blue R₂₅₀.

2.3. Xử lý kết quả nghiên cứu

Kết quả nghiên cứu được xử lý trên phần mềm Excel 2003, xử lý Chi-square và phần mềm Blast (NCBI).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả xác định tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *S. suis* type 2

Mẫu dịch mũi lợn thu thập từ các lò mổ trên địa bàn Thành phố Huế được cho trực tiếp vào môi

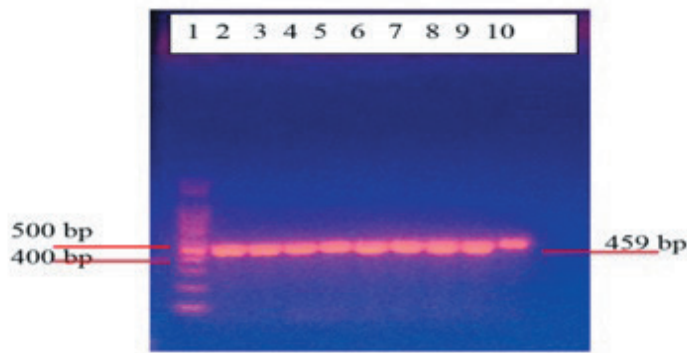
trường BHI và nuôi 16 giờ trong tủ ấm 37°C có bổ sung CO₂ 5%. Tiến hành tách ADN để làm khuôn cho PCR với cặp mồi CPS2, chúng tôi đã xác định được 9 mẫu dương tính với *S. suis* type 2 trong 100 mẫu dịch mũi lợn tại các lò mổ trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế (bảng 1).

Bảng 1. Tỷ lệ nhiễm liên cầu lợn type 2 ở một số lò mổ trên địa bàn Thành phố Huế

Địa điểm lấy mẫu	Số mẫu nghiên cứu	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ dương tính (%)
Lò mổ Bạch Yến	30	4	13,33
Lò mổ Bãi Dâu	40	3	7,50
Lò mổ Xuân Phú	30	2	6,67
Tổng	100	9	9%

9 mẫu dịch mũi lợn cho kết quả PCR dương tính được sử dụng để phân lập liên cầu khuẩn thuần trên môi trường thạch máu. Sau khi nuôi, tiến hành thử nghiệm bile esculin và PCR khẳng

định lại *S. suis* type 2 bằng cặp mồi CPS2. Kết quả điện di cho thấy sản phẩm PCR của cả 9 mẫu là một band đơn nhất có kích thước khoảng 459 bp (hình 1).



Hình 1. Kết quả PCR kiểm tra mẫu dương tính với *S. suis* type 2

Lane 1: Marker 1kb (biobasic), Lane 2-10: các mẫu dương tính

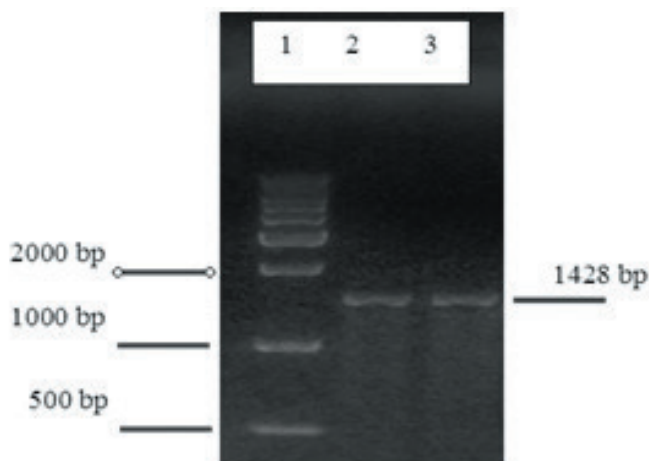
Với kết quả PCR khẳng định lại mẫu dương tính, chúng tôi nhận thấy tỷ lệ nhiễm liên cầu lợn type 2 trên địa bàn Thừa thiên Huế là 9,00%, và có sự khác biệt giữa tỷ lệ nhiễm liên cầu lợn type 2 tại các lò mổ, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Theo nghiên cứu của Ngo Thi Hoa và cộng sự (2011), tỷ lệ mang vi khuẩn *S. suis* type 2 ở lợn khỏe tại miền Nam Việt nam là 8,00% [6].

3.2. Kết quả tạo dòng và biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên 6PGD của *S. suis* type 2

Phân lập vi khuẩn liên cầu lợn thuần trên môi trường thạch máu cừu 5%, nuôi qua đêm ở nhiệt độ 37°C, có bổ sung 5% CO₂. Sau khi nuôi, lựa chọn khuẩn lạc đơn có hình dạng đặc trưng của liên cầu để tiến hành thử nghiệm bile esculin. Tiến hành PCR xác định lại *S. suis* type 2 với cặp mồi CPS2 trên vi khuẩn *Streptococcus spp.*, chúng tôi đã thu được vi khuẩn *S. suis* type 2 thuần. Khi đã

có được vi khuẩn *S. suis* type 2 thuần, chúng tôi tiến hành nhân đoạn gen kháng nguyên 6PGD của

vi khuẩn bằng phương pháp PCR. Kết quả được thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Kết quả PCR nhân đoạn gen kháng nguyên 6PGD từ *S. suis* type 2

Lane 1: Marker 1kb (biobasic); lane 2 và 3: mẫu

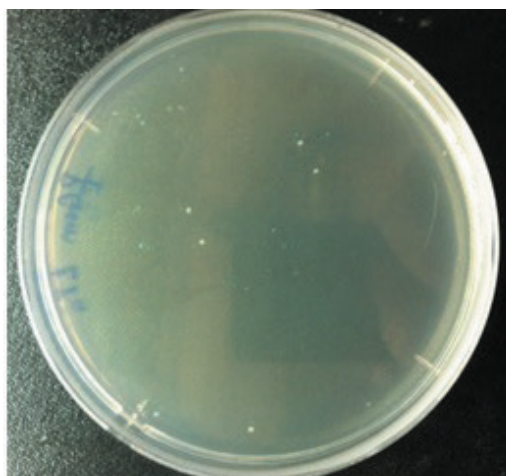
Kết quả điện di cho thấy: sản phẩm PCR của *S. suis* type 2 có kích thước khoảng 1428 bp, tương ứng với chiều dài lý thuyết đoạn ADN của gen 6PGD với cặp mồi 6PGD.F và 6PGD.R, sản phẩm PCR là một băng đơn nhất có chất lượng tốt.

Sản phẩm PCR (gen 6PGD) được gắn vào vector tạo dòng pGem[®]-T easy để tạo vector tái tổ hợp pGem[®]-T easy-6PGD, sau đó biến nạp vào tế

bào khả biến *E. coli* Top 10.

Cấy trải sản phẩm biến nạp trên môi trường đĩa thạch LB có bổ sung ampicillin (50 µg/ml), 30 µl X-gal (20 mg/ml) và 30 µl IPTG 100 mM, nuôi trong tủ ấm 37°C qua đêm.

Kết quả ở hình 3 cho thấy: các khuẩn lạc màu xanh và khuẩn lạc màu trắng trên môi trường thạch đĩa LB.

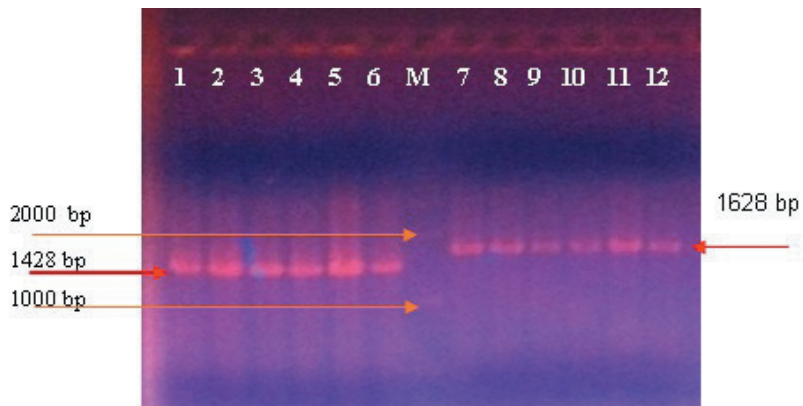


Hình 3. Kết quả biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào khả biến *E. coli* Top 10

Để khẳng định chắc chắn đoạn gen 6PGD có mặt trong các dòng khuẩn lạc màu trắng thu được, chúng tôi tiến hành phản ứng PCR trực tiếp từ khuẩn lạc. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%. Kết quả cho thấy các dòng khuẩn lạc đều cho kết quả dương

tính với phản ứng PCR và kích thước nhân lên theo đúng tính toán lý thuyết đoạn gen dài khoảng 1428 bp.

Đồng thời để kiểm tra kết quả gắn gen 6PGD vào plasmid, chúng tôi tiến hành PCR với cặp mồi M13. Kết quả được ghi ở hình 4.



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân gen 6PGD trực tiếp từ khuẩn lạc

M: Thang ADN chuẩn 1000 bp; 1 - 6 các khuẩn lạc trắng được PCR với primers 6PGD; 7-12 các khuẩn lạc trắng được PCR với primers M13

Các dòng khuẩn lạc dương tính được nuôi trong 5ml môi trường LB lỏng có bổ sung ampicillin (50 µg/ml) ở 37°C qua đêm. Sau đó tiến hành tách chiết plasmid, và gửi đi giải trình tự.

Kết quả phân tích trình tự nucleotid của sản phẩm PCR cho thấy đoạn gen 6PGD phân lập được có độ dài 1428 bp (bao gồm cả stop codon) và tương đồng 99% với gen 6PGD đã được công bố (gb|CP000407.1|). Sự sai khác của một số

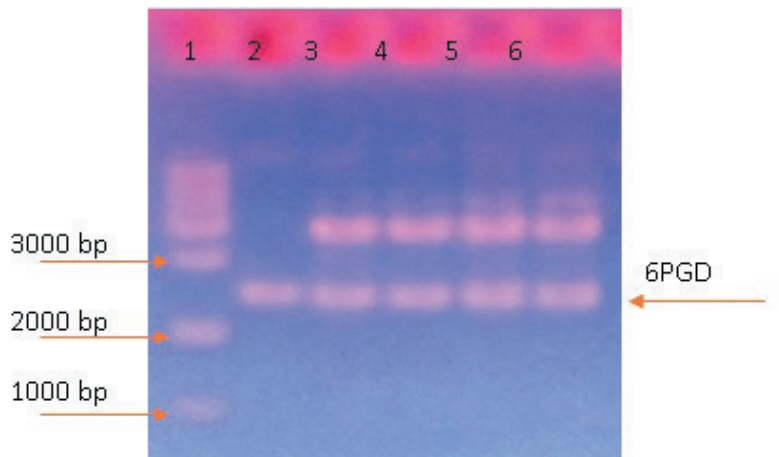
nucleotid không làm ảnh hưởng đến quá trình biểu hiện protein. Kết quả so sánh trình tự amino acid suy diễn cho thấy: gen của *S. suis* type 2 do chúng tôi phân lập được có mức tương đồng cao so với trình tự đã công bố trên ngân hàng gene, chỉ sai khác tại một số vị trí amino acid như ở vị trí 192 (Y được thay bằng H), ở vị trí 345 (P được thay bằng R), vị trí 347 (T được thay bằng A) và ở vị trí 373 (G được thay bằng R), vị trí 371, 372 và 373 (PPP được thay bằng RAR).

Query	1	
MTKANFGVVGMAVMGRNLALNVESRGYSVAIYNRSADKTEDVVASNPGKNLVPSYDVESF	180	
Sbjct	1	
MTKANFGVVGMAVMGRNLALNVESRGYSVAIYNRSADKTEDVVASNPGKNLVPSYDVESF	60	
Query	181	
VASIEKPRRIMLMVQAGPGTDATIQALLPHLDEGDILIDGGNTFYEDTIRRSKELANSKI	360	
Sbjct	61	
VASIEKPRRIMLMVQAGPGTDATIQALLPHLDEGDILIDGGNTFYEDTIRRSKELANSKI	120	
Query	361	
NFIGTGVSGGEKGALEGPSIMPGGQKEAYELVADVLEEISAKAPEDGAPCVTYIGPDGAG	540	
Sbjct	121	
NFIGTGVSGGEKGALEGPSIMPGGQKEAYELVADVLEEISAKAPEDGAPCVTYIGPDGAG	180	
Query	541	
HYVKMVHNGIEHGDMQLIAESYDLMQHLLGLSVDEMADIFTDWNQGELDSYLIEITADIL	720	
Sbjct	181	
HYVKMVHNGIEYGDMLIAESYDLMQHLLGLSVDEMADIFTDWNQGELDSYLIEITADIL	240	
Query	721	
KRKDDQGQDGPVINYIMDAAGNKGTGKWTSSSLDLGVPLSLITESVFARYISTYKDERV	900	
Sbjct	241	
KRKDDQGQDGPVINYIMDAAGNKGTGKWTSSSLDLGVPLSLITESVFARYISTYKDERV	300	
Query	901	
AASKVLPKPAFAYEGDKAELVEKIRQALYFSKIMSQAQGFALPVTSKENNWNLPFGEI	1080	
Sbjct	301	
AASKVLPKPAFAYEGDKAELVEKIRQALYFSKIMSQAQGFALRVASKENNWNLPFGEI	360	
Query	1081	
AKIWGAGCIIIPPFLQKITDAYGRDEDLANLLLDEYFLDVTAKYQQAVRDVVALAVQAGV	1260	
Sbjct	361	
AKIWRAGCIIIPARFLQKITDAYGRDEDLANLLLDEYFLDVTAKYQQAVRDVVALAVQAGV	420	
Query	1261	
PVPTFSAAITFYFDSYRAENLPANLIQAQRDYFGAHTYNRKDKEGIFHYDWYSESK	1425	
Sbjct	421	
PVPTFSAAITFYFDSYRAENLPANLIQAQRDYFGAHTYNRKDKEGIFHYDWYSESK	475	

Mức độ tương đồng của trình tự amino acid suy diễn của kháng nguyên 6PGD do chúng tôi phân lập và kháng nguyên 6PGD đã được công bố

Gene mã hóa protein 6PGD sau khi giải trình tự và so sánh trên ngân hàng gene được cắt giới hạn bằng enzyme BamHI và SalI. Sản phẩm cắt giới hạn được điện

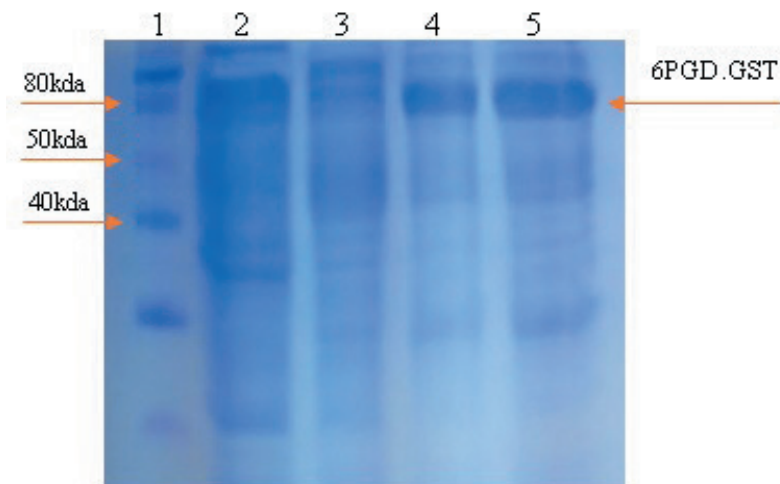
di trên gel agarose và tinh sạch bằng kit Wizard®SV Gel and PCR CleanUp System. Kết quả cắt giới hạn được trình bày trong hình 5.



Hình 5. Kết quả cắt giới hạn plasmid pGEM-T-Easy 6PGD bằng enzyme BamHI và SalI
 1: Thang ADN chuẩn 1kb; 2: DNA 6PGD; 3, 4, 5, 6: plasmid pGEM-T-Easy-6PGD được xử lý bằng enzyme BamHI và SalI

Sau khi tinh sạch ADN từ gel agarose, chúng tôi tiến hành gắn gene 6PGD vào plasmid pGex4T3 đã được xử lý bằng enzyme giới hạn BamHI và Sal I. Dịch gán được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3) bằng phương pháp shock nhiệt. Các khuẩn lạc mang vector biểu hiện pGEX-4T-3-6PGD tái tổ hợp được kiểm

tra bằng PCR. Tế bào *E. coli* BL21 (DE3) được chọn lọc và cảm ứng sinh protein bằng IPTG trong 50 ml môi trường LB ở 25°C ($OD_{600} = 0,8$). Sự biểu hiện của protein 6PGD được kiểm tra bằng điện di polyacrylamide gel 15% có SDS ở 60 V. Sau đó, gel được nhuộm với Coomassie Blue R₂₅₀ để phân tích kết quả.



Hình 6. Biểu hiện của protein 6PGD trong *E. coli* BL21 tái tổ hợp trên gel SDS-PAGE
 1: Thang protein chuẩn (10 -190 kDa, Bioline);
 2: *E. coli* BL21 không biến nạp;
 3: *E. coli* BL21 tái tổ hợp không cảm ứng với IPTG;
 4, 5: *E. coli* BL21 tái tổ hợp cảm ứng với IPTG tại thời điểm 2 giờ và 3 giờ.

Kết quả điện di SDS cho thấy có một băng protein đậm xuất hiện ở vị trí khoảng 78 kDa ở mẫu được cảm ứng, băng này không xuất hiện ở các mẫu đối chứng. Vì vậy, có thể khẳng định gen mã hóa kháng nguyên 6PGD đã được biểu hiện thành công.

Gene mã hóa kháng nguyên 6PGD của *S. suis* type 2 cũng được Chentan và cộng sự (2008) nghiên cứu biểu hiện thành công trên vector pET 28a trong vật chủ *E. coli* BL21 (DE3), kết quả nhóm tác giả thu được protein tái tổ hợp có khối lượng 53 kD [4].

IV. KẾT LUẬN

Sử dụng PCR, chúng tôi đã xác định được tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *S. suis* type 2 trên lợn được mang đến giết mổ ở Thành phố Huế là 9%.

Đã phân lập được vi khuẩn *S. suis* type 2 thuần và đã tạo dòng, biểu hiện thành công gene mã hóa protein 6PGD trong tế bào *E. coli* BL21(DE3). Đoạn gene mã hóa protein 6PGD từ vi khuẩn *S. suis* type 2 có chiều dài là 1428 bp, tương đồng 99% so với gene 6PGD được công bố trên GeneBank. Protein dung hợp 6PGD-GST có khối lượng phân tử khoảng 78 kDa.

Đây là kết quả của đề tài nghiên cứu khoa học cấp Đại học Huế, mã số DHH2015-15-01 và đề tài nghiên cứu khoa học cấp Viện, mã số VCNSH2015-01 được ngân sách nhà nước đầu tư.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Hoàng Lộc, Lê Việt Dũng, Trần Quốc Dung (2007), *Giáo trình Công nghệ ADN tái tổ hợp*, Nxb Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.
2. Phan Lê Thanh Hương. Quy trình nuôi cấy phân lập vi khuẩn *Streptococcus suis*, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.
3. Arends JP, Zanen HC. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev Infect Dis*

1988;10:131-7.

4. Chen Tan, Shulin Fu, Manli Liu, Meilin Jin, Jinlin Liu, Weicheng Bei, Huanchun Chen. Cloning, expression and characterization of a cell wall surface protein, 6-phosphogluconate-dehydrogenase, of *Streptococcus suis* serotype 2. *Veterinary Microbiology* 130 (2008) 363–370
5. Gottschalk M., Segura M., Xu J. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Anim. Health Res. Rev.* 2007;8:29–45.
6. Hoa NT, Chieu TTB, Nga TTT, Dung NV, Campbell J, Anh PH, et al. (2011). Slaughterhouse Pigs Are a Major Reservoir of *Streptococcus suis* Serotype 2 Capable of Causing Human Infection in Southern Vietnam. *PLoS ONE* 6(3): e17943. doi:10.1371/journal.pone.0017943.
7. Mai NT, Hoa NT, Nga TV, et al. *Streptococcus suis* meningitis in adults in Vietnam. *Clin Infect Dis* 2008;46:659-67.
8. Marois C., Bougeard S., Gottschalk M., Kobisch M., Multiplex PCR Assay for Detection of *Streptococcus suis* Species and Serotypes 2 and 1/2 in Tonsils of Live and Dead Pigs, *J Clin Microbiol.* 2004 Jul; 42(7): 3169–3175
9. Vilaichone RK, Vilaichone W, Nunthapisud P, Wilde H, *Streptococcus suis* infection in Thailand. *J Med Assoc Thai* 2002;85(Suppl 1):S109–17
10. Windson R. (1977), Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis* type 2, *Veterinary record* 101, pp. 378.

Nhận ngày 15-11-2016

Phản biện ngày 5-1-2017