

# TẠO DÒNG, BIỂU HIỆN VÀ THỬ NGHIỆM KHẢ NĂNG NGỪNG KẾT VI KHUẨN *Vibrio parahaemolyticus* CỦA C-TYPE LECTIN TỪ TÔM THẺ CHÂN TRẮNG *Litopenaeus vannamei*

Nguyễn Thị Phương Thảo<sup>1,2,3</sup>, Võ Nguyễn Hải Vy<sup>2,3</sup>, Lê Thị Kim Loan<sup>1</sup>, Trần Văn Hiếu<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Trường Đại học Tiền Giang

<sup>2</sup> Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>3</sup> Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

## TÓM TẮT

Trong số các thụ thể nhận diện kiểu mẫu, C-type lectin (CTL) đặc trưng vì sở hữu vùng nhận diện carbohydrate. CTL đóng vai trò then chốt trong đáp ứng miễn dịch bẩm sinh ở động vật không xương sống vì có thể nhận diện và loại bỏ vi sinh vật xâm nhiễm. LvDLdrCTL (*Litopenaeus vannamei* Low-Density Lipoprotein Receptor C-type Lectin), một CTL mới được phát hiện gần đây, có khả năng chống lại tác động của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp. Trong nghiên cứu này, gen mã hóa cho LvDLdrCTL được dòng hóa vào vector pET22b để tạo plasmid tái tổ hợp pET-LvDLdrCTL sau khi thu nhận từ tôm thẻ chân trắng *L. vannamei*. Tiếp đó, plasmid tái tổ hợp sẽ được chuyển vào *E. coli* BL21 (DE3) và tiến hành cảm ứng biểu hiện bằng IPTG. Phương pháp SDS-PAGE và lai miễn dịch Western blot với kháng thể kháng đuôi dung hợp 6xHis được sử dụng để xác nhận sự biểu hiện của protein LvDLdrCTL. Protein LvDLdrCTL từ nghiên cứu này được dùng để thử nghiệm khả năng ngưng kết vi khuẩn *V. parahaemolyticus* với kết quả cho thấy chúng có khả năng ngưng kết *V. parahaemolyticus* gây AHPND.

*Từ khóa:* C-type lectin, hoại tử gan tụy cấp, *Litopenaeus vannamei*, LvDLdrCTL, *Vibrio parahaemolyticus*.

## MỞ ĐẦU

Với việc trở thành nước đứng thứ tư trên thế giới về xuất khẩu tôm với kim ngạch lên đến hàng tỉ đô mỗi năm, ngành nuôi tôm ở Việt Nam đã và đang tăng trưởng vượt bậc cả về diện tích lẫn sản lượng. Nhưng hiện nay, vi thể đó đang gặp nhiều thách thức. Một trong những nguyên nhân hàng đầu là dịch bệnh. Riêng bệnh hoại tử gan tụy cấp (acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND) đã gây thiệt hại đến hàng trăm tỉ đồng với diện tích thiệt hại lên đến 46.093 ha (Vietnam Association of Seafood Exporters and Producers, 2018). Tác nhân gây AHPND được xác định là vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (Vietnam Institute of Fisheries Economics and Planning, 2015), chúng sinh ra độc tố mạnh làm phá hủy nhanh mô và làm rối loạn chức năng gan tụy trong hệ thống tiêu hóa của tôm.

Tương tự các loài động vật không xương sống khác, tôm dựa vào miễn dịch bẩm sinh để bảo vệ chúng trước tác nhân xâm nhiễm (OIE, 2019). Một lượng lớn các phân tử được gọi là thụ thể nhận diện kiểu mẫu (pattern recognition receptor, PRR) có khả năng nhận diện nhiều loại phân tử liên quan đến mầm bệnh (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) (Li *et al.*, 2014) khác nhau điển hình như lipopolysaccharide của vi khuẩn Gram âm và kích hoạt một loạt các phản ứng tiêu diệt tác nhân xâm nhiễm (Xu *et al.*, 2014). Vì lectin là protein có thể gắn kết với glycoprotein hoặc glycolipid trên bề mặt vi sinh vật bằng các liên kết không cộng hóa trị với carbohydrate mà không làm thay đổi cấu trúc của carbohydrate (Iwanaga, Bok, 2005) nên được xếp vào nhóm PRR điển hình. C-type lectin (CTL) từ tôm được chứng minh tham gia vào một loạt các phản ứng miễn dịch bẩm sinh bao gồm nhận diện mầm bệnh, ngưng kết vi khuẩn, diệt vi sinh vật và kháng virus, tăng cường opsonin hóa cũng như đóng gói tế bào (Wongpanya *et al.*, 2017; Liang *et al.*, 2019). Khám phá CTL mới từ tôm rất quan trọng để phát triển các công cụ và chiến lược để phòng và hỗ trợ điều trị các dịch bệnh trên tôm nuôi. Khả năng hỗ trợ miễn dịch trên tôm của CTL mới là LvDLdrCTL (*Litopenaeus vannamei* Low-Density Lipoprotein Receptor C-type Lectin) trong việc chống lại tác động của một số vi khuẩn bao gồm *V. parahaemolyticus* (Liang *et al.*, 2019) khi có thể ngưng kết *V. parahaemolyticus*, tác nhân gây bệnh AHPND ở tôm, đã được chứng minh. Nghiên cứu này là tiền đề khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo với mục đích ứng dụng vào thực tế sản xuất chế phẩm hỗ phòng và điều trị các bệnh trên tôm.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Chủng chủ và plasmid

Chủng *E. coli* DH5α được sử dụng làm chủng chủ nhân bản vector tái tổ hợp. Chủng *E. coli* BL21 (DE3) dùng làm chủng chủ biểu hiện protein tái tổ hợp. Plasmid pET22b được sử dụng làm vector dòng hóa gene LvDLdrCTL, đồng thời là vector biểu hiện protein nhờ vào promoter tac có trên plasmid giúp kiểm soát sự biểu

hiện gene thông qua chất cảm ứng IPTG (Biobasic). Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* XN87 có mang plasmid chứa gen PirA và PirB được dùng để thử nghiệm khả năng ngưng kết được cung cấp bởi TS. Hà Thanh Đông (Wongpanya *et al.*, 2017). Tất cả các chủng vi sinh vật và plasmid được cung cấp bởi Bộ môn Công nghệ Sinh học Phân tử và Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

#### Cấu trúc chủng *E. coli* DH5 $\alpha$ mang vector tái tổ hợp pET-LvDLdlrCTL

Gene *LvDLdlrCTL* được thu nhận từ bộ gene của tôm thẻ chân trắng *L. vannamei* bằng cách sử dụng NucleoSpin RNA Plus kit (Macherey-Nagel, Đức) tách chiết mRNA tổng số từ mô tôm và thu nhận cDNA bằng kỹ thuật RT-PCR sử dụng MyTaq™ One-Step RT-PCR kit (Bioline, Anh) với cặp mồi đặc hiệu 402F *NdeI* (trình tự mồi 5'-CATATGgagtgtagcaacaggg-3') và 403R *XhoI* (trình tự mồi 5'-CTCGAGcgccctctcactggg3'). Trình tự mồi được thiết kế dựa trên gene *LvDLdlrCTL* đã được công bố (GenBank: MH746942.1) (Liang *et al.*, 2019). Gene *LvDLdlrCTL* và plasmid pET22b được nối với nhau bằng enzyme *T4 DNA ligase* (Thermo Scientific, Mỹ) sau khi được xử lý tạo đầu dính với hai enzyme cắt hạn chế *NdeI* và *XhoI* (Thermo Scientific, Mỹ). Dung dịch phản ứng nối sau đó được hóa biến nạp vào chủng chủ *E. coli* DH5 $\alpha$ . Các thể biến nạp thu được trên môi trường LB chứa kháng sinh ampicillin (Biobasic, Anh) nồng độ cuối 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sẽ được tiếp tục sàng lọc bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc với cặp mồi *T7pro/T7ter* trên plasmid. Kết quả tạo dòng được khẳng định bằng phương pháp giải trình tự (Công ty Macrogen, Hàn Quốc) với mồi *T7pro* (mồi trên plasmid pET22b).

#### Cấu trúc chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET-LvDLdlrCTL

Vector tái tổ hợp pET-LvDLdlrCTL có kết quả giải trình tự đúng được hóa biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3) và trải trên môi trường LB có kháng sinh ampicillin nồng độ cuối 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Các dòng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET-LvDLdlrCTL sẽ được sàng lọc bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc với cặp mồi *T7pro/T7ter* trên plasmid.

#### Cảm ứng biểu hiện protein LvDLdlrCTL tái tổ hợp

Chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET-LvDLdlrCTL được nuôi cấy lác ở 37°C trong môi trường LB chứa kháng sinh ampicillin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Sau 16 giờ nuôi cấy, vi khuẩn được cấy chuyển với tỉ lệ 1:20 (v/v) và tiếp tục nuôi cấy lác ở 37°C. Đến khi OD<sub>600</sub> của dịch vi khuẩn đạt giá trị 0,4-0,6; chất cảm ứng IPTG (Biobasic, Anh) được bổ sung vào ống dịch vi khuẩn sao cho nồng độ cuối đạt 0,5 mM và tiếp tục lắc mẫu ở 37°C. Sau 6 giờ cảm ứng, tiến hành thu sinh khối tế bào và phá màng tế bào bằng sóng siêu âm trong dịch ly giải (Tris-HCl 20 mM, EDTA 5 mM, NaCl 1 M, pH 8,0) để thu được protein ở các pha tổng, hòa tan và kết tủa. Sự biểu hiện của protein tái tổ hợp được xác nhận bằng phương pháp SDS-PAGE và lai miễn dịch Western blot với kháng thể kháng 6xHis. Thực hiện đồng thời với mẫu đối chứng âm là mẫu dịch nội bào *E. coli* BL21 (DE3)/pET22b có cảm ứng IPTG.

#### Hòa tan và tái gấp cuộn protein LvDLdlrCTL tái tổ hợp

Sinh khối *E. coli* BL21 (DE3)/pET-LvDLdlrCTL sau khi được cảm ứng biểu hiện sẽ được thu nhận và ly giải trong dịch ly giải bằng sóng siêu âm và tiến hành thu nhận thể vùi tươi. Thể vùi này được rửa trong dịch rửa thể vùi có Triton X-100 (Tris-HCl 20 mM, Triton X-100 2%, pH 8,0) bốn lần và rửa lại với dịch rửa thể vùi không Triton X-100. Thể vùi sau khi rửa được hòa tan trong dịch hòa tan (Tris-HCl 20 mM, Gu-HCl 4 M, pH 8,0), ủ lác trong 1 giờ ở 4°C. Dịch hòa tan sau đó được ly tâm để thu pha nổi và pha tủa cho phân tích. Pha nổi sẽ được tái gấp cuộn bằng phương pháp pha loãng nhanh ở 4°C trong dung dịch tái gấp cuộn (Tris-HCl 20 mM, Urea 2 M, Sucrose 10%, Tween-80 0,1%, pH 8,0) (Trương Hà Minh Nhật *et al.*, 2019).

#### Đánh giá khả năng ngưng kết vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của protein LvDLdlrCTL

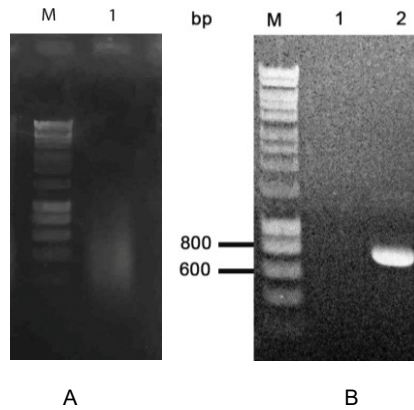
Vi khuẩn Gram âm *V. parahaemolyticus* XN87 được nhuộm bởi Calcein AM (Thermo Scientific, Mỹ) và được hòa lại trong dung dịch đệm TBS-Ca (50 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7,5) ở 10<sup>6</sup> CFU/mL. 10  $\mu\text{L}$  vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được trộn với 20  $\mu\text{L}$  protein LvDLdlrCTL (0,1 mg/mL) hoặc protein đối chứng GST (0,1 mg/mL), sau đó ủ ở 25°C trong 1 giờ. Sự ngưng kết được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang ở bước sóng 490 nm. Để xác định liệu sự ngưng kết phụ thuộc vào canxi hay không thì vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được nhuộm bởi Calcein AM sẽ được ủ với protein LvDLdlrCTL trong dung dịch đệm khác là TBS-EDTA (50 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 4 mM EDTA; pH 7,5) như được mô tả ở trên.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Cấu trúc chủng *E. coli* DH5 $\alpha$ mang vector tái tổ hợp pET-LvDLdlrCTL

Để cấu trúc vector pET-LvDLdlrCTL, tiến hành thu nhận gene *LvDLdlrCTL* từ bộ gene của tôm thẻ chân trắng *L. vannamei* bằng cách tách chiết mRNA tổng số từ mô (Hình 1A, giếng 1) và thu nhận cDNA bằng kỹ thuật RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu 402F *NdeI* và 403R *XhoI*. Gene thu nhận từ phản ứng PCR được kiểm tra kích thước bằng điện di trên gel agarose 1,5%. Kết quả phân tích cho thấy đã thu nhận được duy nhất đoạn gene kích thước 729 bp (Hình 1B, giếng 2), đúng với kích thước gene *LvDLdlrCTL*. Chủng âm của phản ứng PCR được thiết lập với đầy đủ các thành phần như phản ứng thu gene ngoại trừ khuôn là bộ gene của *L. vannamei* nhằm kiểm soát sự ngoại nhiễm của phản ứng PCR thì không ghi nhận bất kỳ band DNA nào trên bản gel (Hình 1B,

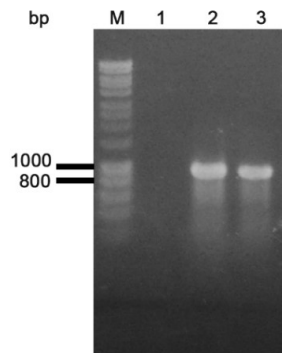
giếng 1), chứng tỏ phản ứng PCR thu gene *LvDLdlrCTL* không bị ngoại nhiễm, đoạn gene thu được có nguồn gốc từ bộ gene *L. vannahae*.



**Hình 1. Thu nhận gene *LvDLdlrCTL* từ mô tôm thẻ chân trắng**

A. Thu nhận RNA từ mô tôm thẻ chân trắng. M, thang DNA 1 kb (Bioline, Anh); 1, sản phẩm thu RNA từ mô tôm.  
B. Thu nhận gene *LvDLdlrCTL* với cặp mồi đặc hiệu. M, thang DNA 1 kb; 1, chứng âm; 2, sản phẩm PCR thu gene

Gene *LvDLdlrCTL* và plasmid pET22b được nối lại bằng T4 ligase sau khi được xử lý tạo đầu dính tương ứng bằng cặp enzyme *NdeI* và *XhoI*. Sản phẩm nối được biến nạp vào *E. coli* DH5 $\alpha$  khả nạp. Do gene kháng kháng sinh ampicillin được thiết kế trên plasmid pET22b nên các thể biến nạp mang vector tái tổ hợp pET-*LvDLdlrCTL* được sàng lọc bằng cách trải trên đĩa môi trường nuôi cấy LB chứa kháng sinh ampicillin. Những tế bào tiếp nhận plasmid tái tổ hợp mới có khả năng kháng ampicilin và mọc được trên đĩa. Các khuẩn lạc dự tuyển này tiếp tục được sàng lọc để xác nhận sự hiện diện của gene *LvDLdlrCTL* bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc với cặp mồi *T7pro/T7ter* trên plasmid. Các khuẩn lạc chứa plasmid tái tổ hợp theo đúng thiết kế sẽ cho sản phẩm có kích thước 1029 bp. Kết quả điện di cho thấy, có sự xuất hiện khuẩn lạc cho band DNA kích thước phù hợp với thiết kế là 1029 bp (Hình 2). Kết quả dương tính là do sự chèn gene *LvDLdlrCTL* vào plasmid pET22b. Cặp mồi này tạo ra sản phẩm kích thước 300 bp nếu là plasmid pET22b nguyên bản. Khuẩn lạc không chứa plasmid sẽ không xuất hiện vạch (Hình 2, giếng 1).



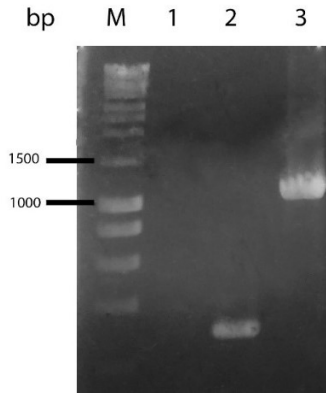
**Hình 2. Kết quả PCR khuẩn lạc với cặp mồi trên plasmid**

M, thang DNA 1 kb (Bioline, Anh); 1, chứng âm không mang plasmid; 2 và 3, các khuẩn lạc dự tuyển

Kết quả giải trình tự đoạn gene *LvDLdlrCTL* trên plasmid tái tổ hợp pET-*LvDLdlrCTL* bằng mồi *T7pro* cho thấy đoạn gene này có độ tương đồng 100% so với trình tự gene *LvDLdlrCTL* của *L. vannahae* đã được công bố (GenBank: MH746942.1) (Liang *et al.*, 2019) và đồng khung dịch mã (số liệu không thể hiện trong bài).

### Tạo dòng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET-*LvDLdlrCTL*

Vector pET-*LvDLdlrCTL* sau khi cấu trúc thành công sẽ được biến nạp vào *E. coli* BL21 (DE3). Hỗn hợp biến nạp được trải trên môi trường thạch LB bổ sung ampicillin. Những khuẩn lạc mọc trên môi trường sàng lọc được lựa chọn ngẫu nhiên để tiến hành PCR kiểm tra sự hiện diện của vector tái tổ hợp bằng cặp mồi *T7pro/T7ter* trên plasmid. Kết quả ở hình 3 cho thấy, vạch điện di xuất hiện ở các khuẩn lạc dự tuyển ở giếng 3 xuất hiện một vạch DNA tương ứng với kích thước 1029 bp, đúng với kích thước của sản phẩm PCR gene *LvDLdlrCTL* với cặp mồi trên plasmid. Khuẩn lạc không chứa plasmid sẽ không xuất hiện vạch (Hình 3, giếng 1). Sản phẩm PCR khuẩn lạc với plasmid không chèn gene sẽ cho kích thước là 300 bp (Hình 3, giếng 2). Như vậy, chúng tôi đã tạo dòng thành công chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET-*LvDLdlrCTL*.

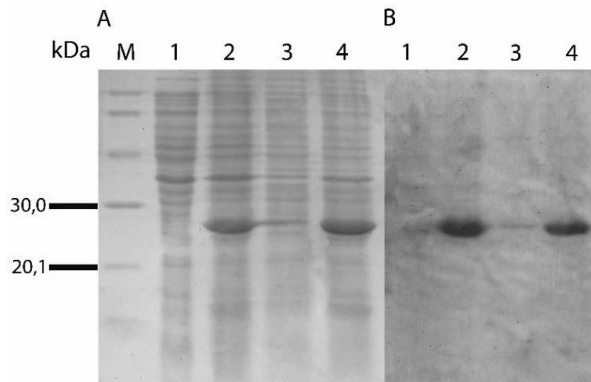


**Hình 3. Kết quả PCR khuẩn lạc với cặp mồi trên plasmid**

M, thang DNA 1 kb (Bioline, Anh); 1, mẫu chứng không mang plasmid; 2, mẫu chứng mang plasmid pET22b; 3, khuẩn lạc dự tuyển

### Kiểm tra sự biểu hiện của protein LvDLdlrCTL

Protein LvDLdlrCTL tái tổ hợp được cảm ứng biểu hiện từ chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET-LvDLdlrCTL như quy trình đã được mô tả ở phần phương pháp. Các mẫu protein pha tổng, tan và tủa được thu nhận và phân tích sự biểu hiện của LvDLdlrCTL bằng phương pháp SDS-PAGE và Western blot. Kết quả phân tích ở hình 4 cho thấy có một vạch protein biểu hiện vượt mức ở giếng 2 và 4 tương ứng pha tổng và kết tủa với kích thước khoảng 27 kDa, bằng với kích thước của protein LvDLdlrCTL và không thấy có sự xuất hiện của vạch này ở chứng âm là *E. coli* BL21 (DE3) có cảm ứng IPTG (Hình 4, giếng 1). Bên cạnh đó, nhận thấy rằng, protein LvDLdlrCTL được biểu hiện ở pha kết tủa, không đúng cấu hình tự nhiên. Vì vậy, để thực hiện các thử nghiệm về khả năng ngưng kết vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, LvDLdlrCTL cần phải được hòa tan và tái gấp cuộn để protein trở về đúng cấu hình tự nhiên ban đầu và có hoạt tính sinh học. Thêm vào đó, do protein LvDLdlrCTL tái tổ hợp được biểu hiện dưới dạng dung hợp với đuôi 6xHis có sẵn trên vector pET22b nên sự hiện diện của LvDLdlrCTL có thể được xác nhận gián tiếp thông qua đuôi 6xHis. Kết quả xác nhận sự hiện diện của LvDLdlrCTL tái tổ hợp bằng phương pháp Western blot với kháng thể kháng đuôi 6xHis ở hình 4 cho thấy vạch protein biểu hiện vượt mức trong bản điện di SDS-PAGE chính là LvDLdlrCTL và protein này được biểu hiện hầu hết ở pha tủa (Hình 4, giếng 4). Như vậy, LvDLdlrCTL tái tổ hợp đã được biểu hiện thành công trên chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET-LvDLdlrCTL. Trong công bố trước đó của Liang và cộng sự (2019), vector pGEX được sử dụng để biểu hiện gene mục tiêu trên chủng *E. coli* BL21 (DE3) nhằm làm tăng tính tan của protein LvDLdlrCTL thông qua đuôi dung hợp GST. Tuy nhiên, kích thước lớn của protein GST (~29 kDa) có thể ảnh hưởng tới cấu trúc protein tái tổ hợp cũng như các ứng dụng miễn dịch sau này. Giải pháp có thể làm cắt đuôi dung hợp GST (sử dụng các protease thương mại hay tái tổ hợp) hoặc thay đuôi dung hợp. Nhằm giảm thiểu sự ảnh hưởng đuôi dung hợp GST, đuôi dung hợp 6xHis (có sẵn trong vector pET) được sử dụng. Tuy nhiên, việc này lại khiến protein khó tan hơn và cần thêm bước tái gấp cuộn.

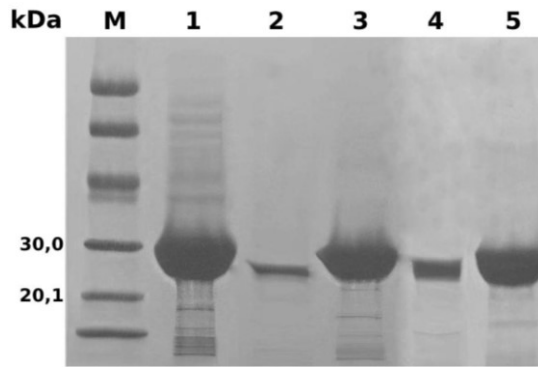


**Hình 4. Kiểm tra và xác nhận sự biểu hiện protein LvDLdlrCTL trong *E. coli* BL21 (DE3)/pET-LvDLdlrCTL bằng phương pháp SDS-PAGE (A) và lai Western (B). M, thang protein 14.4 – 97 kDa (Bio-rad, Mỹ); 1, *E. coli* BL21 (DE3) (IPTG+); 2-4, *E. coli* BL21 (DE3)/pET22b-LvDLdlrCTL (IPTG+) pha tổng (2), pha hòa tan (3), pha kết tủa (4)**

### Hòa tan và tái gấp cuộn protein LvDLdlrCTL tái tổ hợp

Sau khi biểu hiện ở dạng thể vùi, protein LvDLdlrCTL tái tổ hợp được thu nhận và tiến hành hòa tan và tái gấp cuộn theo quy trình được trình bày ở phần phương pháp. Các phân đoạn thể vùi tươi, dịch hòa tan, cặn sau hòa

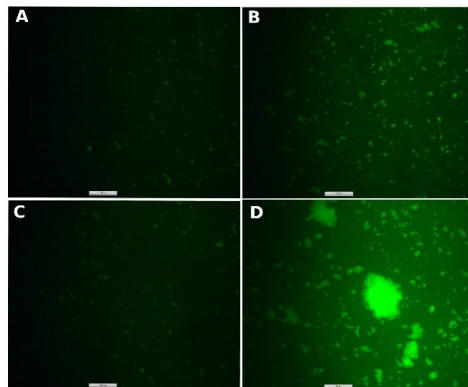
tan, dịch nổi sau tái gấp cuộn và cặn sau tái gấp cuộn được phân tích bằng phương pháp SDS- PAGE (Hình 5). Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy, ở mẫu dịch protein hòa tan có xuất hiện vạch protein vượt mức, kích thước 27 kDa (Hình 5, giếng 3), trong khi mẫu tủa sau khi hòa tan có xuất hiện vạch mỏng hơn nhiều (Hình 5, giếng 3), chứng tỏ protein LvDLdlrCTL phần lớn đã được hòa tan. Sau khi hòa tan, protein LvDLdlrCTL được tiến hành tái gấp cuộn bằng phương pháp pha loãng nhanh. Kết quả cho thấy, ở mẫu dịch protein sau tái gấp cuộn có xuất hiện vạch protein kích thước 27 kDa (Hình 5 giếng 5). Điều này chứng tỏ, protein LvDLdlrCTL phần lớn đã tái gấp cuộn thành công. Như vậy, sau quá trình tái gấp cuộn, protein LvDLdlrCTL từ thể vùi tươi đã được thu nhận ở dạng tan bằng phương pháp hòa tan trong Gu-HCl 4M và pha loãng nhanh trong dung dịch tái gấp cuộn. Với các kết quả đạt được, lần đầu tiên trên thế giới protein LvDLdlrCTL đã được tái gấp cuộn thành công với quy trình đơn giản, tồn tại ở dạng tan và có thể tiếp tục thử nghiệm khả năng ngưng kết.



**Hình 5. Kết quả hòa tan và tái gấp cuộn.**  
 M, thang protein 14.4 - 97 kDa (Bio-rad, Mỹ); 1, thể vùi trước khi hòa tan; 2, cặn sau khi hòa tan;  
 3, dịch protein hòa tan; 4, cặn sau tái gấp cuộn; 5, dịch protein sau tái gấp cuộn

### Đánh giá khả năng ngưng kết vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của protein LvDLdlrCTL

Khi quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang, ta thấy *V. parahaemolyticus* bị ngưng kết bởi LvDLdlrCTL trong dung dịch đệm TBS-Ca (Hình 6D). Mặt khác, không thấy sự hình thành ngưng kết trong dung dịch đệm TBS-EDTA (Hình 6C) và ở chứng âm, sử dụng protein GST thay cho LvDLdlrCTL (Hình 6B). Các kết quả này phù hợp với giả thuyết rằng chỉ khi calcium được bổ sung thì LvDLdlrCTL mới có thể ngưng kết *V. parahaemolyticus* gây AHPND.



**Hình 6. Đánh giá khả năng ngưng kết vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của LvDLdlrCTL**  
 A, *V. parahaemolyticus* + TBS; B, *V. parahaemolyticus* + GST;  
 C, *V. parahaemolyticus* + LvDLdlrCTL + TBS-EDTA; D, *V. parahaemolyticus* + LvDLdlrCTL + TBS-Ca

### KẾT LUẬN

Từ các kết quả thu được, chúng tôi đi đến kết luận: Đề tài đã cấu trúc thành công vector tái tổ hợp mang gene LvDLdlrCTL mã hóa cho protein LvDLdlrCTL có nguồn gốc từ *L. vannamei*; tạo thành công chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector pET-LvDLdlrCTL có khả năng biểu hiện protein LvDLdlrCTL ở dạng thể vùi; bước đầu tái gấp cuộn thành công protein này. Bên cạnh đó, chúng tôi đã thử nghiệm khả năng ngưng kết vi khuẩn *V. parahaemolyticus* với kết quả đạt được là protein LvDLdlrCTL có khả năng gắn và gây ngưng kết vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, tác nhân chính gây bệnh AHPND trên tôm nuôi. Kết quả đạt được từ thử nghiệm này đã đặt nền móng cho các đánh giá sâu hơn về hoạt tính của protein LvDLdlrCTL trong ngưng kết vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND trên tôm.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Tiền Giang trong khuôn khổ đề tài mã số T2015-14.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Iwanaga S, Bok LL (2005). Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Int J Biochem Mol Biol* 39(2): 113.
- Liang Z, Yang L, Zheng J, Zuo H, Weng S, He J, Xu X (2019). A low-density lipoprotein receptor (LDLR) class A domain-containing C-type lectin from *Litopenaeus vannamei* plays opposite roles in antibacterial and antiviral responses. *Dev Comp Immunol* 92: 29-34.
- Li M, Li C, Ma C, Li H, Zuo H, Weng S, Cheng X, Zeng D, He J, Xu X (2014). Identification of a C-type lectin with antiviral and antibacterial activity from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Dev Comp Immunol* 46(2): 231-240.
- OIE (2019). *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals* (2019).
- Phiwsaiya K, Charoensapsri W, Taengphu S, Dong HT, Sangsuriya P, Nguyen GT, Pham HQ, Amparyup P, Sritunyalucksana K, Taengchaiyaphum S, Longyant S, Sithigorngul P, Chaivisuthangkura P (2017). A natural *Vibrio parahaemolyticus* ΔpirAVp pirBVp+ mutant kills shrimp but produces neither PirVp toxins nor acute hepatopancreatic necrosis disease lesions. *Appl Environ Microbiol* 83(16): e00680-17.
- Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, LeibundGut-Landmann S, Sousa CR (2006). Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol* 7(12): 1258-1265.
- Trương Hà Minh Nhật, Huỳnh Kiến Quang và Trần Văn Hiếu (2019). Tạo dòng, biểu hiện và tái gấp cuộn prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) chuột dung hợp với GST. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 55(5B): 16-22.
- Vietnam Association of Seafood Exporters and Producers (2018). *Vietnam shrimps export: look back 20 years*.
- Vietnam Institute of Fisheries Economics and Planning (2015). Brackish water shrimp farming planning in Mekong Delta region. *Ministry of Agriculture and Rural Development*.
- Wongpanya R, Sengprasert P, AmparyupP, Tassanakajon A (2017). A novel C-type lectin in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* functions as a pattern recognition receptor by binding and causing bacterial agglutination. *Fish Shellfish Immunol* 60: 103-113.
- Xu H, Yang J, Gao W, Li L, Li P, Zhang L, Gong Y, Peng X, Xi JJ, Cheng S, Wang F (2014). Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. *Nature* 513(7517): 237-241.

## CLONING, EXPRESSION OF *Vibrio parahaemolyticus* C-TYPE LECTIN FROM WHITE LEG SHRIMP *Litopenaeus vannamei* FOR BACTERIAL AGGLUTINATING

**Nguyen Thi Phuong Thao<sup>1,2,3</sup>, Vo Nguyen Hai Vy<sup>2,3</sup>, Le Thi Kim Loan<sup>1</sup>, Tran Van Hieu<sup>2,3\*</sup>.**

<sup>1</sup>Tien Giang University

<sup>2</sup>University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City

<sup>3</sup> Vietnam National University Ho Chi Minh City

## SUMMARY

Among the pattern recognition receptors (PRRs), C-type lectins (CTLs) are characteristic because of containing carbohydrate recognition domain. Because of recognising and eliminating invasive microorganisms, CTLs play key roles in innate immunity of invertebrates. LvDLdr1CTL (*Litopenaeus vannamei* Low-Density Lipoprotein Receptor C-type Lectin), a recently discovered CTL, is able to resist the effects of *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). In this study, a LvDLdr1CTL-encoding gene was cloned into pET22b vector to construct the recombinant pET-LvDLdr1CTL plasmid after being collected from *L. vannamei*. Plasmid was then transferred into *E. coli* BL21 (DE3) and induced for protein expression. SDS-PAGE and Western blot were used to confirm the expression of LvDLdr1CTL protein. The recombinant protein from this study then was used for agglutinating analysis with results showing that they are able to agglutinate AHPND-causing *V. parahaemolyticus*.

**Keywords:** Acute hepatopancreatic necrosis disease, C-type lectin, *Litopenaeus vannamei*, LvDLdr1CTL, *Vibrio parahaemolyticus*.

\* Author for correspondence: Tel: +84-983260781; Email: tvhieu@hcmus.edu.vn