

## BIỂU HIỆN PROTEIN TOLL-LIKE RECEPTOR 22 TỪ CÁ TRA *Pangasianodon hypophthalmus* VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG TƯƠNG TÁC VỚI VI KHUẨN

Nguyễn Thanh Tấn<sup>1,3</sup>, Trần Văn Hiếu<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Phòng thí nghiệm Cầm biến Sinh học, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Bộ môn Công nghệ Sinh học Phân tử và Môi trường, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

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

### TÓM TẮT

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là loài cá da trơn được nuôi phổ biến nhất ở Đồng bằng sông Cửu Long, nổi bật với giá trị dinh dưỡng cao và nhu cầu tiêu thụ ngày càng tăng cả trong và ngoài nước. Để nâng cao sức cạnh tranh, cần tập trung phát triển, nâng cao chất lượng và sản lượng cá tra. Trong những năm gần đây, việc sản xuất và tiêu thụ cá tra gặp nhiều khó khăn như do giá cả không ổn định, dịch bệnh ở cá, trong đó bệnh gan thận mủ và bệnh xuất huyết có tỉ lệ chết cao (50-90%). Việc sử dụng kháng sinh để điều trị dịch bệnh ở cá dẫn đến dư lượng kháng sinh trong thịt cá và hiện tượng kháng thuốc. Hơn nữa, vaccine hiện tại còn gặp nhiều hạn chế về phân phối và bảo quản. Do đó, chúng tôi hướng tới việc phát triển chế phẩm sinh học mới nhằm phòng bệnh gan thận mủ và bệnh xuất huyết cho cá tra, cũng như các bệnh do vi khuẩn ở cá nói chung. Thụ thể Toll-like receptor (TLR) 22 chỉ được tìm thấy ở cá, có khả năng nhận diện, liên kết với dsRNA từ virus và lipopolysaccharide nhờ vào các trình tự lặp lại giàu leucine (LRR). Vì vậy, vùng LRR của TLR22 có thể được ứng dụng để bắt vi khuẩn. Trong nghiên cứu này, thụ thể TLR22 được tạo ra dưới dạng protein tái tổ hợp và tiến hành đánh giá tương tác với vi khuẩn. Plasmid pET22b-*tlr22* được cấu trúc trong *E. coli* MC1061, và thụ thể TLR22 được biểu hiện ở *E. coli* SHuffle<sup>®</sup> T7 Express và xác nhận bằng Western blot với kháng thể kháng His-tag (6xHis). Khả năng bắt vi khuẩn được đánh giá bằng kỹ thuật Dot blot, với kết quả cho thấy thụ thể TLR22 có khả năng bắt vi khuẩn Gram dương. Nghiên cứu này là tiền đề cho việc phát triển chế phẩm sinh học bổ sung thức ăn cho cá, điều trị bệnh ở cá tra và các loài cá khác.

Từ khóa: Gram dương, LRR, *Pangasianodon hypophthalmus*, Toll-like receptor 22, *Streptococcus agalactiae*.

### MỞ ĐẦU

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là loài cá da trơn được nuôi phổ biến nhất Đồng bằng sông Cửu Long. Thêm vào đó, cá tra là thực phẩm mang giá trị dinh dưỡng cao, được tiêu thụ ngày càng nhiều ở trong và ngoài nước. Ngoài vai trò cung cấp nguyên liệu trong lĩnh vực thực phẩm, da cá tra còn có thể dùng để tách chiết collagen, ứng dụng trong mỹ phẩm, thực phẩm chức năng. Ở ĐBSCL, các tỉnh/thành có diện tích nuôi và sản lượng cá tra lớn gồm Đồng Tháp; An Giang; Cần Thơ, và được xuất khẩu sang hơn 180 quốc gia và vùng lãnh thổ trên thế giới (Thi, 2017). Theo báo cáo VASEP (Hiệp hội chế biến và xuất khẩu thủy sản Việt Nam) đến tháng 10 năm 2023 doanh thu xuất khẩu cá tra đạt 1,5 tỷ USD giảm 29% so với cùng kì năm 2022. Hiện nay, cá tra đang là mặt hàng được quan tâm và nước ta là một trong những quốc gia có lợi thế về ngành nuôi trồng, xuất khẩu cá tra. Ngoài Việt Nam, một số quốc gia khác như Indonesia, Trung Quốc cũng đang tập trung phát triển ngành này. Để nâng cao sức cạnh tranh, chúng ta phải không ngừng phát triển, nâng cao chất lượng và sản lượng. Tuy nhiên, trong những năm gần đây, việc sản xuất và tiêu thụ cá tra đang phải đối mặt với nhiều khó khăn và thách thức do giá cả bấp bênh, thị trường xuất khẩu không ổn định và dịch bệnh trên cá ngày càng tăng. Để đạt những tiêu chí trên thì chủ đầu tư cần phải giảm chi phí đầu tư bằng cách tăng hiệu suất sử dụng thức ăn và kiểm soát tốt dịch bệnh ở cá.

Hiện nay, thách thức lớn nhất của chúng ta đối với ngành hàng này là các vấn đề về dịch bệnh, cá dễ bị tấn công bởi nhiều loại vi sinh vật gây bệnh. Trong đó, vi khuẩn Gram âm là nguyên nhân chính gây bệnh gan thận mủ và bệnh xuất huyết là một trong số những bệnh có tỉ lệ chết cao (50-90%) (Thi, 2017). Hơn thế, cá tra còn bị nhiễm bệnh bởi các loài vi khuẩn Gram dương, đặc biệt là *Streptococcus agalactiae*, là một trong những vi khuẩn Gram dương gây bệnh ở cá, gây xuất huyết và tỷ lệ tử vong rất cao (45%) (Trần *et al.*, 2016; Meidong *et al.*, 2021). Bên cạnh gây bệnh trên cá, nhiều nghiên cứu đã cho thấy *S. agalactiae* có liên quan đến các trường hợp bùng phát bệnh Streptococcosis ở người sau khi ăn cá, cho thấy khả năng của nó như một tác nhân lây truyền từ động vật sang người (Kalimuddin *et al.*, 2017). Tính đến thời điểm hiện nay, sử dụng kháng sinh là một phương pháp điều trị hữu hiệu khi cá mắc bệnh này. Tuy nhiên, dư lượng kháng sinh trong thịt cá, và hiện tượng kháng thuốc đang là những vấn đề quan trọng cần phải giải quyết của phương pháp này. Tuy nhiên, tiêm hay ngâm cá giống trong vaccine gặp nhiều vấn đề về phân phối thuốc, cá giống có hệ miễn dịch chưa hoàn chỉnh nên hiệu quả vaccine

kém; vaccine uống tạo miễn dịch dịch thể không mạnh mẽ, gặp khó khăn trong việc bảo quản, vận chuyển (Wise *et al.*, 2015). Do đó, ngoài việc phòng ngừa bằng vaccine thì đề tài mong muốn hướng đến tìm ra một biện pháp an toàn hơn để phòng bệnh trên cá tra.

Ở cá, hệ miễn dịch bẩm sinh là tuyến phòng thủ ban đầu khi có sự xâm nhiễm. Trong đó, Toll-like Receptor (TLR) là một họ thụ thể có khả năng nhận diện các cấu trúc mẫu phân tử của vi sinh vật (PAMPs). TLR22 là thành viên của họ TLR, và chỉ được tìm thấy ở cá. Thông qua các trình tự lặp lại giàu leucine (Leucine-rich Repeat – LRR), TLR22 có khả năng nhận diện, và liên kết với dsRNA ở virus, và lipopolysaccharide (LPS). Do đó, vùng LRR này có thể được sử dụng để bắt những vi khuẩn gây bệnh trên cá. Với bản chất là protein, vùng LRR có thể được tạo ra dưới dạng protein tái tổ hợp, và tiến hành đánh giá tương tác với vi khuẩn. Kết quả này sẽ là tiền đề cho việc phát triển sản phẩm sinh học hỗ trợ điều trị bệnh ở cá do vi khuẩn gây ra sau này. Kết quả của nghiên cứu này sẽ được ứng dụng làm tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn để có thể ứng dụng trong việc phát triển vaccine uống trong việc phòng ngừa và điều trị bệnh ở cá tra và các loài cá khác.

## NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Chủng vi khuẩn và plasmid

Chủng *E. coli* MC1061 được sử dụng làm chủng chủ để nhân bản plasmid tái tổ hợp. Chủng *E. coli* SHuffle® T7 Express sử dụng làm chủng chủ biểu hiện protein tái tổ hợp. Plasmid pET22b được sử dụng làm plasmid dòng hóa, đồng thời là plasmid biểu hiện protein tái tổ hợp nhờ vào promoter T7 có trên plasmid giúp kiểm soát sự biểu hiện gen thông qua chất cảm ứng IPTG (isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside) (Biobasic). Môi trường nuôi cấy sử dụng cho cả hai chủng đều là Luria – Bertani (LB) chứa 100 µg/mL Ampicillin (Sigma Aldrich) ở 37°C. Các chủng vi sinh vật, plasmid, và hoá chất được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Cảm biến Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh; Viện nuôi trồng Thủy sản 2; và Đại học Tài nguyên và Khoa học sự sống/BOKU, Viên, Cộng hoà Áo.

### Cấu trúc plasmid tái tổ hợp pET22b-*tlr22*

Gen *tlr22* được thu nhận từ G-Blocks™ Gen Fragments (Twist Bioscience Mỹ), mang trình tự gen mã hoá cho protein TLR22 bằng kỹ thuật PCR (Máy PCR Mastercycler, Eppendorf, Đức) với chu trình luân nhiệt: 95°C trong 5 phút, tiếp theo đó là 30 chu kỳ: 95°C trong 30 giây, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây, 72°C trong 10 phút, 25°C trong 5 phút, với cặp mỗi đặc hiệu 998FNde: tggtaacttaagaagagatatacatatgtccaaagtgcg và 999RXho: gatctcagtggtggtggtggtgctcagagaatgaagaaag (PHUSA Biochem, Việt Nam). Sau khi thu nhận, gen mục tiêu được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5%. Plasmid pET22b được xử lý với hai enzyme cắt hạn chế *NdeI* và *XhoI* (Thermo Scientific, Mỹ). Sau khi xử lý với cặp enzyme cắt giới hạn, plasmid pET22b đã cắt và gen *tlr22* được nối với nhau bằng phương pháp RFC (recombinase-free cloning) (Vo-Nguyen *et al.*, 2022). Sản phẩm RFC được biến nạp vào tế bào *E. coli* MC1061 khả nạp, sản phẩm biến nạp sau đó được trải trên đĩa LB chứa kháng sinh Ampicillin đạt nồng độ cuối 100 µg/mL. Thẻ biến nạp được sàng lọc bước đầu trên môi trường LB-Amp và được tiếp tục sàng lọc bằng kỹ thuật PCR với cặp mỗi chéo (T7pro/999RXho). Các khuẩn lạc dương tính được tách chiết và gửi giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự được công bố trên Ngân hàng gen.

### Biểu hiện protein tái tổ hợp TLR22

Sau khi đã cấu trúc thành công plasmid tái tổ hợp pET22b-*tlr22*, tiến hành thu nhận plasmid bằng phương pháp Alkaline Lysis (Ehrt *et al.*, 2003). Plasmid sau khi thu nhận được biến nạp vào chủng biểu hiện *E. coli* SHuffle® T7 Express khả nạp bằng phương pháp sốc nhiệt và sản phẩm biến nạp được trải trên đĩa LB chứa kháng sinh Ampicillin đạt nồng độ cuối 100 µg/mL. Các dòng *E. coli* SHuffle® T7 Express/pET22b-*tlr22* được sàng lọc thông qua kỹ thuật PCR khuẩn lạc với cặp mỗi trên plasmid (T7Pro/T7Ter). Chủng *E. coli* SHuffle® T7 Express/pET22b-*tlr22* được nuôi cấy lắc ở 30°C trong môi trường LB chứa kháng sinh Ampicillin (100 µg/mL). Sau 16 giờ nuôi cấy, vi khuẩn được cấy chuyển với tỉ lệ 1:10 (v/v) và tiếp tục nuôi cấy lắc ở 30°C. Đến khi OD<sub>600nm</sub> của dịch vi khuẩn đạt giá trị 0,8–1,0, chất cảm ứng IPTG được bổ sung vào ống dịch vi khuẩn sao cho nồng độ cuối đạt 0,5 mM, tiếp tục lắc mẫu ở 16°C. Sau 6 giờ cảm ứng, tiến hành thu sinh khối tế bào (sinh khối trong 1,5 mL dịch nuôi cấy được hòa trong 300 µL PBS 1X) và phá màng tế bào bằng sóng siêu âm để thu được protein ở các pha tổng, tan và tủa. Sự biểu hiện của protein tái tổ hợp được kiểm tra bằng phương pháp điện di SDS-PAGE và nhuộm Coomassie Brilliant Blue G-250 (Biobasic). Thực hiện đồng thời với mẫu đối chứng âm là mẫu dịch pha tổng của *E. coli* SHuffle® T7 Express/pET22b-*tlr22* không có cảm ứng IPTG. Sau đó protein mục tiêu được xác nhận bằng Western blot với kháng thể đặc hiệu kháng anti His-tag (ProteinTech, Mỹ). Cơ chất TMB (3,3',5,5'-tetra methyl benzidine, Thermo Scientific, Mỹ) được bổ sung vào sẽ phản ứng với HRP (Horseradish peroxidase enzyme) gắn trên kháng thể đặc hiệu tạo tín hiệu màu trên màng, từ đó xác nhận được sự có mặt của protein mục tiêu.

### Đánh giá khả năng bắt vi khuẩn của protein TLR22 bằng kỹ thuật Dot blot

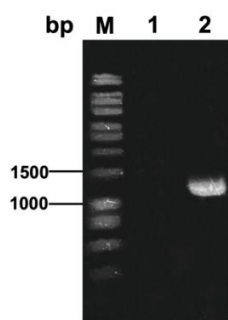
Để kiểm tra khả năng bắt vi khuẩn của TLR22 tái tổ hợp, các mẫu vi khuẩn *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae*, *Lactiplantibacillus plantarum* được ủ với dịch protein tổng ở pha tan. Vi khuẩn *A. hydrophila* được tăng sinh trong môi trường TSB lỏng lắc qua đêm (16-24 tiếng), ở 30°C. Vi khuẩn *E. coli* DH5α được tăng sinh trong môi trường LB lỏng lắc qua đêm (16-24 tiếng), ở 37°C. Vi khuẩn *S. agalactiae* được tăng sinh trong môi trường BHI lỏng lắc qua đêm (16-24 tiếng), ở 37°C. Vi khuẩn *L. plantarum* được tăng

sinh trong môi trường MRS lỏng qua đêm (16-24 tiếng), ở nhiệt độ phòng, không lắc. Các loài vi khuẩn được dùng phương pháp đo độ đục OD<sub>600nm</sub> để điều chỉnh dịch huyền phù. Đối với *E. coli*, OD<sub>600nm</sub> ≈ 1,0 (tương đương 10<sup>8</sup> CFU/mL) (Burns, Hull, 1999); *A. hydrophila*, OD<sub>600nm</sub> ≈ 1,0 (tương đương 10<sup>9</sup> CFU/mL) (Orozova *et al.*, 2012); *S. agalactiae*, OD<sub>600nm</sub> ≈ 0,9 (tương đương 10<sup>9</sup> CFU/mL) (Rajagopal *et al.*, 2005), *L. plantarum*, OD<sub>600nm</sub> ≈ 0,22 (tương đương 10<sup>8</sup> CFU/mL) (Hosiana *et al.*, 2020). Mật độ vi khuẩn ban đầu được xác định lại bằng phương pháp đếm khuẩn lạc. Pha loãng dịch vi khuẩn đồng nhất về 10<sup>6</sup> CFU/mL, ly tâm ở 5.000 rpm trong 5 phút để thu sinh khối và hoà lại bằng PBS 1X. Sau đó, các mẫu vi khuẩn được chuyển lên màng nitrocellulose đã được khoá bằng BSA 5%. Cuối cùng, kháng thể kháng His-tag gắn HRP được bổ sung lên màng. Ở thí nghiệm này chứng dương là các dịch tổng protein TLR22 ủ với kháng thể kháng His-tag gắn HRP. Chứng âm sẽ sử dụng dịch protein tổng ở pha tan của chủng *E. coli* SHuffle<sup>®</sup> T7 Express không mang plasmid tái tổ hợp.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

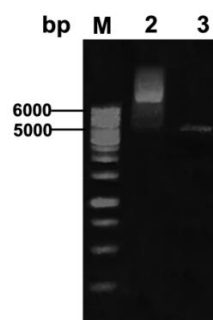
### Cấu trúc plasmid tái tổ hợp pET22b-*tlr22*

Nhằm mục đích dòng hóa plasmid tái tổ hợp pET22b-*tlr22*, gen *tlr22* được thu nhận bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu 998FNde và 999RXho trên plasmid khuôn là G-Block. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên bản gel agarose cho thấy vạch gen thu được (Hình 1, giếng 2), phù hợp với kích thước dự đoán ban đầu của gen *tlr22* là 1.436 bp so với thang phân tử lượng.



Hình 1. Kết quả PCR thu nhận gen *tlr22* và phân tích bằng điện di trên gel agarose 1,5%

M, thang DNA 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ); 1, chứng âm; 2, sản phẩm PCR thu gen *tlr22*

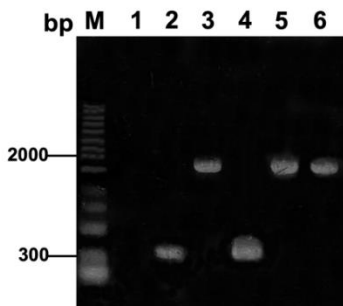


Hình 2. Kết quả thu nhận, xử lý plasmid pET22b với cặp enzyme *NdeI/XhoI* và phân tích bằng điện di trên gel agarose 1,5%

M, thang DNA 1 kb; 1, plasmid chưa xử lý với enzyme; 2, plasmid đã xử lý với cặp enzyme *NdeI/XhoI*

Plasmid pET22b được thu nhận từ chủng *E. coli* DH5α/pET22b bằng phương pháp Alkaline Lysis. Tiến hành xử lý mẫu plasmid đã thu được với cặp enzyme cắt giới hạn *NdeI* và *XhoI*. So sánh với kết quả điện di plasmid ban đầu tồn tại ở ba dạng cấu hình (Hình 2, giếng 2), plasmid đã cắt còn một dạng cấu hình dạng thẳng do đã cắt mở vòng thành công.

Các khuẩn lạc *E. coli* MC1061 mọc trên đĩa môi trường được chọn ngẫu nhiên để thực hiện PCR khuẩn lạc với cặp mồi chéo (T7Pro/999RXho) nhằm kiểm tra việc mang plasmid tái tổ hợp pET22b-*tlr22*. Hình ảnh bản gel điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc xuất hiện vạch DNA ở giếng 3; 5; và 6, với kích thước xấp xỉ 1.636 bp, phù hợp với kích thước dự đoán khi PCR khuôn plasmid pET22b-*tlr22* (Hình 3). Kết quả cho thấy có 3 trong 4 khuẩn lạc dự tuyển mang plasmid tái tổ hợp mục tiêu pET22b-*tlr22*. Các khuẩn lạc dương tính được tách chiết, giải trình, và so sánh với trình tự được công bố. Kết quả cho thấy gen *tlr22* đã được dòng hóa đồng khung và đúng với trình tự công bố trên Ngân hàng gen (kết quả không trình bày).

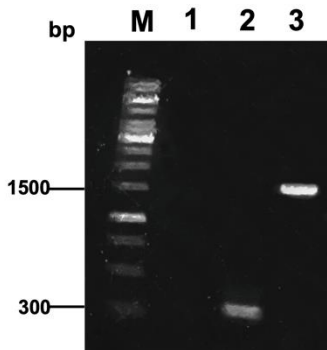


Hình 3. Kết quả PCR sàng lọc thể biến nạp *E. coli* MC1061/pET22b-*tlr22* bằng cặp mồi T7Pro/T7Ter và phân tích bằng điện di trên gel agarose 1,5%

M, thang DNA 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ); 1, chứng âm; 2, chứng dương với khuôn pET22b; 3-6, các khuẩn lạc dự tuyển sàng lọc

### Kiểm tra sự biểu hiện protein tái tổ hợp TLR22

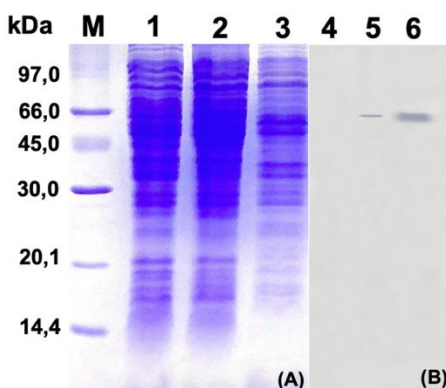
Tương tự việc kiểm tra dòng hóa trên chủng *E. coli* MC1061. Bản gel điện di Hình 4 cho thấy, sản phẩm PCR khuẩn lạc *E. coli* SHuffle® T7 Express dự tuyển xuất hiện vạch DNA ở vị trí xấp xỉ vạch 1.736 bp của thang phân tử lượng, phù hợp kích thước dự đoán khi dòng tế bào dự tuyển mang plasmid pET22b-*tlr22*; đồng thời, chứng âm là sản phẩm phản ứng PCR không bổ sung khuôn không thấy xuất hiện vạch. Như vậy, có thể kết luận plasmid tái tổ hợp pET22b-*tlr22* đã được biến nạp thành công vào chủng biểu hiện *E. coli* SHuffle® T7 Express sẵn sàng để được cảm ứng biểu hiện protein tái tổ hợp TLR22.



**Hình 4. Kết quả PCR sàng lọc thể biến nạp *E. coli* SHuffle® T7 Express /pET22b-*tlr22* bằng cặp mồi T7Pro/T7Ter và phân tích bằng điện di trên gel agarose 1,5%**

*M*, thang DNA 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ); 1, chứng âm; 2, plasmid pET22b; 3, khuẩn lạc dự tuyển sàng lọc.

Kết quả cảm ứng biểu hiện được trình bày ở hình điện di SDS-PAGE nhuộm Coomassie (Hình 5-A) và Western blot (Hình 5-B) cho thấy rằng có sự biểu hiện của protein, nhưng không thể hiện được sự biểu hiện vượt mức ở bản gel nhuộm Coomassie, vì thế không thể quan sát ở kết quả gel nhuộm Coomassie. Quan sát kết quả Western blot sau khi bổ sung cơ chất TMB cho thấy rằng, protein TLR22 biểu hiện đúng với khoảng kích thích dự đoán là 53 kDa. Bên cạnh đó chứng âm là *E. coli* SHuffle® T7 Express được cảm ứng IPTG không thấy xuất hiện vạch protein tương ứng, điều này cũng cho thấy bản thân chủng *E. coli* SHuffle® T7 Express không có trình tự gen mã hóa cho các protein mục tiêu. Cụ thể hơn, protein TLR22 biểu hiện ở dạng thể vùi và thể tan với mức độ biểu hiện rất thấp (Hình 5-B, giếng 5, giếng 6). Như vậy, đã biểu hiện thành công của thụ thể TLR22 tái tổ hợp trên chủng *E. coli* SHuffle® T7 Express protein với điều kiện biểu hiện là 0,5 mM IPTG ở 30°C.



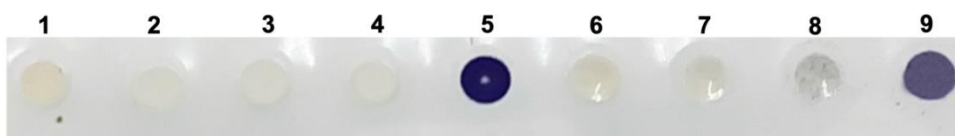
**Hình 5. Kết quả kiểm tra biểu hiện bằng điện di SDS-PAGE trên gel 12,5% nhuộm Coomassie (A) và khẳng định protein TLR22 bằng Western blot (B)**

*M*, thang protein (GE Healthcare, Mỹ); 1 và 4, *E. coli* SHuffle® T7 Express; 2 và 5, *E. coli* SHuffle® T7 Express/pET22b-*tlr22* ở pha tan; 3 và 6, *E. coli* SHuffle® T7 Express/pET22b-*tlr22* ở pha tủa.

Thụ thể TLR22 tự nhiên ở cá tra có sự biến đổi sau dịch mã cùng với ba cầu nối disulfide, yếu tố ảnh hưởng đến sự gấp cuộn đúng của thụ thể (Quiniou *et al.*, 2013). Nghiên cứu trước, tiểu phần thụ thể TLR22(Irr8-11) đã được biểu hiện ở chủng *E. coli* BL21(DE3) hoàn toàn ở dạng thể vùi (Mai Quốc Gia *et al.*, 2022). Vì vậy, trong nghiên cứu này, sử dụng chủng biểu hiện *E. coli* SHuffle® T7 Express thay cho chủng *E. coli* BL21(DE3) nhằm tạo cầu nối disulfide trong việc hỗ trợ gấp cuộn đúng và làm tăng tính tan của các protein mục tiêu. Kết quả SDS-PAGE và Western blot cho thấy, thụ thể TLR22 (ba cầu nối disulfide) chỉ thu được ở dạng thể vùi. Điều này cho thấy, việc sử dụng chủng *E. coli* SHuffle® T7 Express thay vì *E. coli* BL21(DE3) đã cải thiện sự biểu hiện hòa tan của TLR22. Mặc khác, vai trò của cấu trúc cầu nối disulfide của TLR22 ở cá tra vẫn chưa được làm rõ, nên vẫn khảo sát thêm các hệ thống biểu hiện khác như nấm men hoặc tế bào động vật. Đối với nghiên cứu này, chúng tôi

bước đầu đánh giá khả năng tương tác của thụ thể TLR22 với vi khuẩn. Mặt khác, TLR22 sẽ được tối ưu cho việc biểu hiện protein ở các nghiên cứu tiếp theo.

**Đánh giá khả năng bắt vi khuẩn của protein TLR22 bằng kỹ thuật Dot blot**



Hình 6. Đánh giá khả năng tương tác của TLR22 với vi khuẩn bằng kỹ thuật Dot blot

Bảng 1. Mô tả các nghiệm thức Dot blot

Chấm	Vi khuẩn	Mẫu
1	<i>A. hydrophila</i>	
2	<i>E. coli</i>	Dịch protein tổng ở pha tan của chủng <i>E. coli</i> SHuffle® T7 Express không mang plasmid tái tổ hợp.
3	<i>S. agalactiae</i>	
4	<i>L. plantarum</i>	
5	PBS	
6	<i>A. hydrophila</i>	Dịch protein tổng ở pha tan của chủng <i>E. coli</i> SHuffle® T7 Express biểu hiện protein TLR22
7	<i>E. coli</i>	
8	<i>S. agalactiae</i>	
9	<i>L. plantarum</i>	

Quan sát kết quả Dot blot cho thấy rằng, có tín hiệu màu ở chứng dương, cho thấy kháng thể His-tag gắn HRP bắt được protein TLR22 (Hình 6, chấm 5) không có hoặc có tín hiệu màu nhưng rất mờ ở các đối chứng âm (Hình 6, chấm 1-4). So với chứng âm kết quả cho thấy, có tín hiệu màu sau khi bổ sung cơ TMB ở hai mẫu là *S. agalactiae* (Hình 6, chấm 8) và *L. plantarum* (Hình 6, chấm 9), vì vậy có thể kết luận rằng TLR22 có khả năng bắt với vi khuẩn Gram dương. Điều này cho thấy có sự khác biệt với các công bố lý thuyết trước đây dự đoán thụ thể TLR22 có thể tương tác với vi khuẩn Gram âm (Zhang *et al.*, 2017). Tuy nhiên, với ở kết quả trong nghiên cứu này cho thấy TLR22 có khả năng tương tác với vi khuẩn Gram dương và tương tác yếu hay không tương tác với vi khuẩn Gram âm. Đây là một phát hiện mới vì chưa có bất kỳ công bố nào trên thế giới ghi nhận thực nghiệm về khả năng tương tác của thụ thể TLR22 với Gram dương cũng như so sánh mức độ tương tác với Gram âm và Gram dương. Phát hiện này một lần nữa mở ra thêm ứng dụng cho TLR22 do cá tra vẫn bị nhiễm bệnh bởi vi khuẩn Gram dương như *S. agalactiae* nên nếu sử dụng thụ thể TLR22 có thể bắt được vi khuẩn Gram âm như các công bố trước đây và vừa có thể bắt được vi khuẩn Gram dương như trong nghiên cứu này.

**KẾT LUẬN**

Biểu hiện thành công thụ thể TLR22 tái tổ hợp trên chủng *E. coli* SHuffle® T7 Express ở điều kiện 30°C, nồng độ chất cảm ứng là 0,5mM IPTG. TLR22 có khả năng tương tác *in vitro* với vi khuẩn Gram dương thông qua kỹ thuật Dot blot, nhưng khả năng bắt vi khuẩn Gram dương còn thấp. Khó khăn hiện nay là chưa có tài liệu hoặc nghiên cứu nào đã và đang tìm hiểu sâu về thụ thể TLR22, nên việc hiểu rõ các đặc tính của TLR22 ở cá tra vẫn còn gặp còn nhiều hạn chế. Để có thể ứng dụng và phát triển chế phẩm sinh học bổ sung thức ăn cho cá thì đề tài này cần nghiên cứu sâu về các vùng chức năng/tiểu phần thụ thể, tối ưu việc biểu hiện, tinh sạch protein ở hiệu suất cao và cần sử dụng hệ thống biểu hiện protein có đủ những biến đổi sau dịch mã cần thiết cho việc biểu hiện các thụ thể TLR22.

**Lời cảm ơn:** Đề tài này được sự tài trợ bởi Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh An Giang cho chủ nhiệm đề tài Trần Văn Hiếu.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Burns SM, Hull SI (1999) Loss of resistance to ingestion and phagocytic killing by O- and K- mutants of a uropathogenic *Escherichia coli* O75: K5 strain. *Infect Immun* 67: (8) 3757-3762.

Hosiana N, Astuti D, Surono I (2020) Physio-chemical, Microbiology, and Preference of Probiotic Fresh Soft Cheese Using *Lactobacillus plantarum* IS-10506 and *Streptococcus thermophilus* as Mixed Starter Culture. Vol. 426 ed.^eds.), p.^pp. 012185. IOP Publishing.

- Kalimuddin S, Chen SL, Lim CT, Koh TH, Tan TY, Kam M, Wong CW, Mehershahi KS, Chau ML, Ng LC (2017) 2015 epidemic of severe *Streptococcus agalactiae* sequence type 283 infections in Singapore associated with the consumption of raw freshwater fish: a detailed analysis of clinical, epidemiological, and bacterial sequencing data. *Clin Infect Dis* 64: (2) S145-S152.
- Mai Quốc Gia, Lê Thị Xuân Trang, Trần Văn Hiếu (2022) Tạo dòng, biểu hiện và tái gấp cuộn Toll-like receptor 22 từ cá tra *Pangasianodon hypophthalmus*. *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2022* Tiểu ban Công nghệ Sinh học Nông nghiệp.
- Meidong R, Nakao M, Sakai K, Tongpim S (2021) *Lactobacillus paraplantarum* L34b-2 derived from fermented food improves the growth, disease resistance and innate immunity in *Pangasius bocourti*. *Aquacult* 531: 735878.
- Orozova P, Sirakov I, Petkov I, Crumlish M, Austin B (2012) Recovery of *Aeromonas hydrophila* associated with bacteraemia in captive snakes. *FEMS Microbiol Let* 334: (1) 22-26.
- Rajagopal L, Vo A, Silvestroni A, Rubens C (2005) Regulation of purine biosynthesis by a eukaryotic-type kinase in *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol* 56: (5) 1329-1346.
- Thi QVC (2017) Nghiên cứu đặc điểm bệnh học và cơ chế đa kháng thuốc của hai loài vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila* gây bệnh trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nuôi thâm canh ở Đồng bằng sông cửu long. Thesis.
- Trần NTN, Nghĩa NT, Oanh ĐTH (2016) Xác định tính kháng khuẩn của vi khuẩn lactic với vi khuẩn (*Streptococcus agalactiae*) phân lập từ cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) bệnh phù mắt và xuất huyết. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ* 42: (42) 48-55.
- Vo-Nguyen HV, Nguyen TT, Mai QG, Tran TT, Tran TL, Tran-Van H (2022) Recombinase-free cloning (RFC) protocol for gene swapping. *Mol Biol Res Comm* 11: (1) 21.
- Wise DJ, Greenway TE, Byars TS, Griffin MJ, Khoo LH (2015) Oral vaccination of channel catfish against enteric septicemia of catfish using a live attenuated *Edwardsiella ictaluri* isolate. *J Aqua Animal Health* 27: (2) 135-143.
- Zhang XT, Zhang GR, Shi ZC, Yuan YJ, Zheng H, Lin L, Wei KJ, Ji W (2017) Expression analysis of nine Toll-like receptors in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) responding to *Aeromonas hydrophila* challenge. *Fish Shell Immunol* 63: 384-393.

## EXPRESSION OF TOLL-LIKE RECEPTOR 22 OF *Pangasianodon hypophthalmus* AND EVALUATION OF THE INTERACTION WITH BACTERIA

Thanh-Tan Nguyen<sup>1,3</sup>, Hieu Tran-Van<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biosensors, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>2</sup>Department of Molecular and Environmental Biotechnology, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam

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

### SUMMARY

Catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) is one of the most commonly farmed catfish species in the Mekong Delta. Both domestically and internationally, people are increasingly consuming catfish due to their high nutritional value. To enhance competitiveness, we need to focus on developing and improving the quality and quantity of catfish. In recent years, the production and consumption of catfish have faced numerous challenges, including unstable prices and fish diseases, particularly the high mortality rate (50-90%) due to liver, kidney, and hemorrhagic diseases. The use of antibiotics in disease treatment leads to antibiotic residues in fish meat and drug resistance. Vaccines for fish still have many limitations in distribution and preservation. As a result, we aimed to develop a new biological product capable of preventing liver, kidney, and hemorrhagic disease in fish, as well as bacterial diseases in fish in general. Only fish harbors the Toll-like receptor (TLR) 22 receptor, which recognizes and binds to viral dsRNA and lipopolysaccharides through leucine-rich repeat sequences (LRR), which can be exploited to capture bacteria. In this study, we produced the TLR22 receptor as a recombinant protein and evaluated its interaction with bacteria. We constructed the plasmid pET22b-*tlr22* in *E. coli* MC1061, expressed the TLR22 receptor in *E. coli* SHuffle® T7 Express, and confirmed it by Western blot using anti-His-tag (6xHis) antibodies. The Dot-blot technique assessed the bacterial binding ability. Results showed that the TLR22 receptor could bind to Gram-positive bacteria. This study is a foundation for further research on developing biological products to supplement fish feed for treating bacterial diseases in catfish, and other fish species.

**Keyword:** Gram-positive bacteria, Leucine-rich repeat, *Pangasianodon hypophthalmus*, TLR22, *Streptococcus agalactiae*.

\* Author for correspondence: Tel: 0983260781; Email: tvhieu@hcmus.edu.vn