



TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA PROTEIN p65 TỪ *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* GÂY BỆNH SUYỄN LỢN TRONG VI KHUẨN *ESCHERICHIA COLI* BL21 (DE3)

Huỳnh Văn Chương^{1*}, Đặng Thanh Long¹, Đinh Thị Bích Liên², Hoàng Thị Kim Hồng³,
Phùng Thăng Long², Lê Đức Thọ², Lê Quốc Việt¹, Võ Phước Khánh⁴

¹ Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tinh lộ 10, Ngọc Anh, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

² Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

³ Trường Đại học Khoa Học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

⁴ Trường Đại học Quảng Nam, 102 Hùng Vương, Tam Kỳ, Quảng Nam, Việt Nam

Tóm tắt. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tạo dòng và biểu hiện thành công gen p65 mã hóa protein p65 của *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) được phân lập từ các mẫu phổi lợn ở Thừa Thiên Huế. Đoạn gen p65 được khuếch đại và gắn vào vector pET 200/D-TOPO và sau đó biến nạp vào chủng *Escherichia coli* BL21 (DE3). Kết quả cho thấy rằng gen p65 có kích thước khoảng 936 bp, mức tương đồng với trình tự gen được công bố trên GenBank (mã số: CP003131.1) là 100%, mã hóa chuỗi polypeptide dài 311 axit amin và có tương đồng với chuỗi polypeptide được công bố trên GenBank (mã số: AAB67173.1) là 100%. Phân tích điện di SDS-PAGE trong điều kiện biến tính cho thấy protein dung hợp 6xHis-p65 có khối lượng phân tử khoảng 37 kDa.

Từ khóa: lợn, gen p65, *Mycoplasma hyopneumoniae*

1 Đặt vấn đề

Bệnh viêm phổi lợn do *Mycoplasma* (*Mycoplasma pneumoniae* of swine – MPS) còn được gọi là viêm phổi địa phương do *Mycoplasma hyopneumoniae* là một tác nhân gây bệnh viêm phổi trên lợn được phát hiện tại nhiều quốc gia. Đây là một trong những bệnh phổ biến và gây tổn thất kinh tế trong ngành chăn nuôi lợn [6]. Bệnh làm giảm khả năng tăng trọng, giảm hiệu suất chuyển hóa thức ăn, tăng chi phí điều trị bệnh [1]. Vi khuẩn *M. hyopneumoniae* làm tổn hại hệ thống lông rung của đường hô hấp, là yếu tố mở đường cho các tác nhân gây bệnh khác, bao gồm vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* và các loại virus như cúm lợn (swine influenza), virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS) làm bệnh trở nên phức tạp và khó giải quyết hơn [3].

M. hyopneumoniae gây bệnh viêm phổi ở lợn có nhiều kháng nguyên bề mặt có tính miễn dịch cao trong đó có prolipoprotein p65 (p65); đây là protein màng chủ yếu nằm trên bề mặt của *M. hyopneumoniae* có tính kháng nguyên cao và có tiềm năng lớn trong việc chế tạo vaccine và

* Liên hệ: hvanchuong@hueuni.edu.vn

Nhận bài: 3-8-2018; Hoàn thành phản biện: 20-8-2018; Ngày nhận đăng: 28-8-2018

kháng thể để phòng trị bệnh viêm phổi ở lợn [4, 7]. Vì vậy, trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả tạo dòng và biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên p65 làm nguyên liệu để tạo chế phẩm dùng trong phòng và trị bệnh viêm phổi do *M. hyopneumoniae* gây ra ở lợn.

2 Nguyên liệu và phương pháp

2.1 Nguyên liệu

Mẫu phổi được lấy tại các lò mổ lợn trên địa bàn Tỉnh Thừa Thiên Huế; vector nhân dòng pGEM-T (Promega), vector biểu hiện pET200/D-TOPO (Invitrogen), chủng *E. coli* TOP10, *E. coli* BL21 (DE3); hóa chất tách chiết ADN và một số môi trường, vật liệu thường dùng trong phòng thí nghiệm như: Yeast Extract (Difco-Mỹ), Trypton (Difco -Mỹ), EDTA (Sigma-Mỹ), a xít acetic (Merk-Đức), Kanamycin, Ampicillin (Merk-Đức), X-gal (Sigma-Mỹ), agarose (Sigma-Mỹ), cồn tuyệt đối (Prolabo-Pháp), IPTG (Bio-Rad-Mỹ).

Môi trường LB: 0,5% dịch chiết nấm men, 1% tryptone và 1% NaCl; Môi trường SOB: 2% peptone, 0,5% dịch chiết nấm men, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ và 10 mM MgSO₄; Môi trường SOC: môi trường SOB và 20 mM glucose; Môi trường TB: 1,2% peptone, 2,4% dịch chiết nấm men, 72 mM K₂HPO₄, 17 mM KH₂PO₄ và 0,4% glycerol; môi trường YJ: 2% glycerol, 1,5% tryptone, 2% dịch chiết nấm men, 0,25% K₂HPO₄.12H₂O, 0,016% KH₂PO₄, 0,05% NaCl và 0,025% MgSO₄.7H₂O

2.2 Phương pháp

Thu thập mẫu và tách chiết ADN

Tại vùng phổi có bệnh tích, lấy khoảng 0,5g mô cho vào fancol 15 chứa 0,4 mL dung dịch nước muối sinh lý. Mẫu được đựng trong bình đá và đưa về phòng thí nghiệm để được tách chiết ADN.

Bệnh phẩm được đồng nhất bằng cối chày sứ và pha với nước sinh lý thành huyền dịch bệnh phẩm 15%, ly tâm huyền dịch ở 6.000 vòng/phút trong 5 phút. Thu dịch nổi, lấy 200 µL cho vào ống Eppendorf sạch thêm vào 500 µL (0,1 M NaCl; 0,05 M Tris và 0,01 M EDTA, pH 8.0) và bổ sung 30 µL SDS (10%), 20 µL protein K (10 mg/mL), ủ ở 50 °C trong 30 phút, chuyển nhanh lên đá.

Tách chiết bằng hỗn hợp phenol, chloroform và isoamyl alcohol (PCI): sau khi phân giải dịch mẫu, thêm 200 µL hỗn hợp PCI (25:4:1), lắc đều và ly tâm 12.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4 °C (lặp lại bước này một lần nữa). Lấy 350 µL dịch nổi chứa ADN phía trên và kết tủa ADN bằng ethanol 100%, để nhiệt độ -20 °C trong 60 phút. Thu cặn ADN bằng cách ly tâm 15.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4 °C; rửa ADN bằng ethanol 70%. Sau đó, ly tâm 12.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4 °C; loại bỏ hoàn toàn ethanol; giữ cặn ADN, để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng; hòa tan ADN thu được bằng 50 µL TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM Na₂EDTA.H₂O, pH 7,2).

Phân lập và tạo dòng gen mã hóa p65

Sản phẩm ADN sau khi tách chiết được sử dụng làm khuôn cho phân lập gen p65 bằng kỹ thuật PCR. Vùng gen tổng hợp protein p65 của *M. hyopneumoniae* được chọn vùng đích để thiết kế cặp mồi thu nhận gen p65 (có mã số trên ngân hàng gen là CP003131.1). Thành phần nucleotide của các mồi dùng trong phản ứng PCR: Mh65-F: 5'-ATGGCGAAAAATTTTACT-3'; Mh65-R: 5'-TTAGTTTGATTTAGAATCGGTACTTGA-3', độ dài sản phẩm dự đoán khoảng 936 bp.

Phản ứng PCR được tiến hành với tổng thể tích là 50 μ L bao gồm 2 μ L ADN (100 ng), 25 μ L 2 \times PCR master mix (2,4 mM dNTP mỗi loại, 0,3 đơn vị Taq ADN polymerase), 20 pmol mỗi mồi và nước vô trùng. Chu trình nhiệt 95 °C: 5 phút; (95 °C: 1 phút; 48 °C: 1 phút; 72 °C: 3 phút) 30 chu kỳ; 72 °C: 10 phút, giữ mẫu ở 4 °C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% và được tinh sạch bằng Isolate II PCR and Gel Kit (Bioline). Gen p65 được gắn vào vector pGEM-T Easy tạo vector pGEM-p65, biến nạp vào chủng *E. coli* TOP10 bằng phương pháp sốc nhiệt. Các dòng plasmid tái tổ hợp mang gen p65 được chọn lọc theo phương pháp khuẩn lạc xanh trắng [5]. Sau đó được tách chiết bằng EZ-10 Spin Column Plasmid ADN Minipreps Kit (Bio Base) và kiểm tra bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi M13 được thiết kế sẵn trên vector pGEM-T Easy và cặp mồi đặc hiệu cho gen p65. Trình tự nucleotide của gen được xử lý bằng phương pháp dideoxyterminater. Kết quả giải trình tự được phân tích trực tuyến với Ngân hàng gen thế giới sử dụng công cụ BLAST.

Tạo dòng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET-p65

Vector tái tổ hợp pGEM-p65 được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR thu nhận vùng gen mã hóa tạo kháng nguyên p65 với cặp mồi Mh65-F: 5'-CACCATGGCGAAAATTTACT-3'; Mh65-R: 5'-TTAGTTTGATTTAGAATCGGTACTTGA-3'. Trình tự CACC thêm vào ở đầu 5' giúp tạo dòng định hướng cho sản phẩm PCR trong vector và được thiết kế bổ sung cho phần lồi ra GTGG của vector pET200/D-TOPO. Thành phần phản ứng PCR bao gồm 1 μ L vector tái tổ hợp pGEM-p65 (30 ng), 20 pmol mỗi mồi, 5 μ L đệm PCR 10x, 1 μ L dNTP (10 pmol/ μ L), 1 μ L enzyme pfu (5U/ μ L), 40 μ L nước cất vô trùng, thực hiện chu trình nhiệt như trình bày trên. Sản phẩm PCR từ vector tái tổ hợp pGEM-p65 được kiểm tra trên gel agarose và tinh sạch, tiến hành gắn vào vector pET và được hóa biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3), trải trên môi trường LB có bổ sung 100 μ g/mL kanamycin. Các dòng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET-p65 được sàng lọc bằng kỹ thuật PCR trực tiếp từ khuẩn lạc với cặp mồi Mh65-F và Mh65-R, đồng thời tách chiết, tinh sạch plasmid và điện di sản phẩm trên gel agarose.

Cảm ứng biểu hiện p65 tái tổ hợp

Chủng *E. coli* BL21 (DE3)/ pET-p65 được nuôi cấy lắc ở 37 °C trong môi trường YJ chứa kháng sinh kanamycin (100 μ g/mL). Sau 16 giờ nuôi cấy, vi khuẩn được cấy chuyển với tỉ lệ 1:20 (v/v) và tiếp tục nuôi cấy lắc ở 37 °C, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Đến khi OD₆₀₀ của vi khuẩn đạt

giá trị 0,9–1,0, chất IPTG được bổ sung vào ống dịch vi khuẩn sao cho nồng độ cuối đạt 1 mM. Tiếp tục lắc mẫu ở 37 °C, sau 8 giờ cảm ứng, tiến hành thu sinh khối tế bào và phá vỡ màng tế bào bằng sóng siêu âm để thu protein tổng số nội bào có chứa protein dung hợp 6xHis-p65. Sự biểu hiện của protein tái tổ hợp được xác nhận bằng phương pháp SDS-PAGE, đồng thời thực hiện với mẫu đối chứng âm là mẫu dịch pha tổng số của *E. coli* BL21(DE3) không mang vector tái tổ hợp.

3 Kết quả và thảo luận

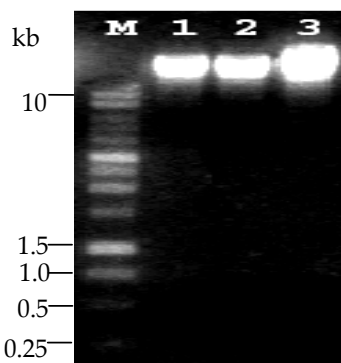
3.1 Tách chiết ADN tổng số

Các mẫu phổi lợn có biểu hiện mắc bệnh viêm phổi sau khi tách chiết ADN tổng số được điện di trên gel agarose 0,8%. Kết quả điện di cho thấy chất lượng sản phẩm có nồng độ cao, rõ nét và sạch không bị đứt gãy (Hình 1). Vì thế, có thể sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR phân lập gen p65.

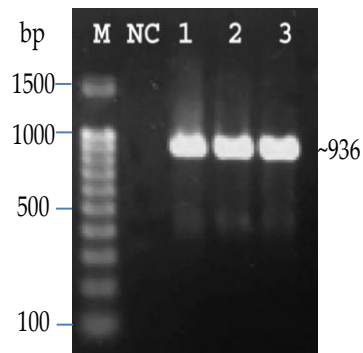
Phân lập gen mã hóa protein p65

Hệ gen hoàn chỉnh của *M. hyopneumoniae* bao gồm 921093 bp (có mã số CP003131.1 trên GenBank) có khoảng 689 gen mã hóa cho protein [2]. Trong đó, vùng gen mã hóa cho p65 của *M. hyopneumoniae* có chiều dài khoảng 936 bp (từ vị trí nucleotide 862335 đến 863270) mã hóa cho chuỗi polypeptide dài 311 aminoacid được chọn làm vùng đích để thiết kế cặp mồi thu nhận gen p65.

Kết quả phân lập gen p65 bằng phản ứng PCR như mô tả ở phần phương pháp. Kiểm tra sản phẩm bằng điện di trên gel agarose 1% (Hình 2) xuất hiện 1 băng duy nhất có kích thước khoảng 936 bp tương ứng với kích thước của gen p65 được khuếch đại, chứng tỏ toàn bộ quy trình thực hiện phản ứng PCR là chính xác.



Hình 1. Điện di ADN tổng số trên gel agarose 0,8%
M: Thang chuẩn ADN (0,25–10 kb); 1,2 và 3: ADN tổng số từ các mẫu khác nhau

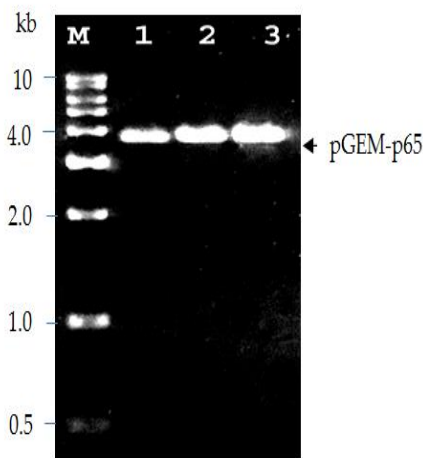


Hình 2. Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1%
M: Thang chuẩn ADN (100–1500 bp); NC: Đối chứng âm;
1,2 và 3: Sản phẩm PCR

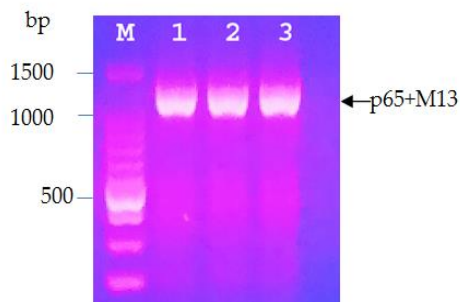
3.2 Tạo dòng và giải trình tự gen p65

Sản phẩm PCR chứa gen mã hóa p65 được tinh sạch và gắn vào vector pGEM-T Easy, biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng TOP10, cấy trên đĩa thạch LB bổ sung X-gal, IPTG, ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), để 37 °C qua đêm. Plasmid từ 3 dòng khuẩn lạc màu trắng được chọn lọc nuôi qua đêm, tách chiết, tinh sạch, điện di kiểm tra sau khi biến nạp trên gel agarose 1%. Kết quả cho thấy sản phẩm PCR chứa duy nhất một vạch ADN có kích thước khoảng 3953 bp bao gồm (kích thước của vector và gen p65) tại các giếng 1,2 và 3 (Hình 3).

Bên cạnh đó, sự hiện diện của gen p65 cũng được kiểm tra gián tiếp với cặp mồi M13 được thiết kế trên vector có trình tự: M13F: 5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3'; M13R: 5'CAGGAAACAGCTATGAC-3 và điện di kiểm tra trên gel agarose 1%. Kết quả cho thấy xuất hiện băng ADN có kích thước khoảng 1136 bp bao gồm (một đoạn khoảng 200 bp nằm trên vector và gen p65) được thể hiện ở các giếng 1, 2 và 3 (Hình 4).



Hình 3. Điện di kiểm tra sản phẩm plasmid pGEM-p65 trên gel agarose 1%
M: Thang chuẩn ADN (0,25–10 kb); 1,2 và 3: Sản phẩm plasmid tái tổ hợp



Hình 4. Điện di sản phẩm PCR với cặp mồi M13 trên gel agarose 1%
M: Thang chuẩn ADN (100–1500 bp); 1, 2 và 3: Sản phẩm PCR

Để khẳng định chắc chắn gen được tách dòng là p65, plasmid đã được chọn để kiểm tra tiến hành giải trình tự. So sánh kết quả giải trình tự với trình tự p65 trên Ngân hàng gen thế giới qua chương trình so sánh trực tuyến BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Kết quả cho thấy trình tự mà chúng tôi thu được là gen p65 của *M. hyopneumoniae* với độ tương đồng 100% với trình tự nucleotide gen p65 đã đăng ký trên GenBank (có mã số CP003131.1) (Hình 5).

Kết quả so sánh trình tự amino acid suy diễn của gen mã hóa p65 chúng tôi phân lập có độ tương đồng 100% với trình tự amino acid của gen mã hóa p65 đã được công bố trên Ngân hàng gen (có mã số AAB67173.1) (Hình6).

p65	1	ATGGCGAAAAATTTTGACTTCCACCCCTTCAATTCAGGTTATAAAAAAATTGCTCACCAA	60
CP003131.1	862335	ATGGCGAAAAATTTTGACTTCCACCCCTTCAATTCAGGTTATAAAAAAATTGCTCACCAA	862394
p65	61	CTTTTGTTA AAAATTAACCTCTTGACCAAGAAAGAAAAAGATGATTTCTAATGCTCGAAGAGCTA	120
CP003131.1	862395	CTTTTGTTA AAAATTAACCTCTTGACCAAGAAAGAAAAAGATGATTTCTAATGCTCGAAGAGCTA	862454
p65	121	AAAAACTACTACAAATTTGATGATTTTGATGAGAATAAACCGACCTATTCCAAAGTTATT	180
CP003131.1	862455	AAAAACTACTACAAATTTGATGATTTTGATGAGAATAAACCGACCTATTCCAAAGTTATT	862514
p65	181	GACCTAAGTGT TTTTGCAAAAATCAATAAAGAATTTCTTGAAAAATTAACGAAAAATAAG	240
CP003131.1	862515	GACCTAAGTGT TTTTGCAAAAATCAATAAAGAATTTCTTGAAAAATTAACGAAAAATAAG	862574
p65	241	CAAAC TAGTGAATTTATGCTCAAAAATCCACTTTTGACACCGATCAAGAAAGCTGCAATC	300
CP003131.1	862575	CAAAC TAGTGAATTTATGCTCAAAAATCCACTTTTGACACCGATCAAGAAAGCTGCAATC	862634
p65	301	AAAGACGACAAACCGCACTTTTGGAATAATAGTTGAGAAATGATATCTTTACCAATCTTC	360
CP003131.1	862635	AAAGACGACAAACCGCACTTTTGGAATAATAGTTGAGAAATGATATCTTTACCAATCTTC	862694
p65	361	GATAATTTTGATTTTAGAGAGTTAATACCTGTTAAAAATCCGTTTGTAAAAGCAATTATT	420
CP003131.1	862695	GATAATTTTGATTTTAGAGAGTTAATACCTGTTAAAAATCCGTTTGTAAAAGCAATTATT	862754
p65	421	AACAGCTATTTAGGGAACCGAGCTGGTCTCTTATAAAAAGATATCGAACCACTCGAAAAAT	480
CP003131.1	862755	AACAGCTATTTAGGGAACCGAGCTGGTCTCTTATAAAAAGATATCGAACCACTCGAAAAAT	862814
p65	481	AAAGTGAAAGATTACGCAAGACTAATAACAAGATTTTGGATACAATTATTGACTCATTTC	540
CP003131.1	862815	AAAGTGAAAGATTACGCAAGACTAATAACAAGATTTTGGATACAATTATTGACTCATTTC	862874
p65	541	ATAAGAAAAATGGTAGCATT TTTTGCTGAAATTAACACTGATCAAGAAATAAAGAATTC	600
CP003131.1	862875	ATAAGAAAAATGGTAGCATT TTTTGCTGAAATTAACACTGATCAAGAAATAAAGAATTC	862934
p65	601	AAAATGTCACCTCAAATACTATTTCTGACACTAAGAAATGCAATAGTCCATTTGAT	660
CP003131.1	862935	AAAATGTCACCTCAAATACTATTTCTGACACTAAGAAATGCAATAGTCCATTTGAT	862994
p65	661	TTAAC TAAATTA AAAAGACAGTGTACTATTA AAAATTTTAAATGGGTCTCAAAC CAGAACAA	720
CP003131.1	862995	TTAAC TAAATTA AAAAGACAGTGTACTATTA AAAATTTTAAATGGGTCTCAAAC CAGAACAA	863054
p65	721	ATATTAAC TCTACTAGGCTAGGTA AAAACCCCTTCAGTTCTTAAACCTGAAAAACCAAAA	780
CP003131.1	863055	ATATTAAC TCTACTAGGCTAGGTA AAAACCCCTTCAGTTCTTAAACCTGAAAAACCAAAA	863114
p65	781	GATCAAGGTTCTATGCCACAAACAGATACTTCTAGTCAAAAACCAAGAAAGCGGAAACAGGT	840
CP003131.1	863115	GATCAAGGTTCTATGCCACAAACAGATACTTCTAGTCAAAAACCAAGAAAGCGGAAACAGGT	863174
p65	841	TCAACAGATTCAACAAAAGCTACAAC TGA AAAACCAAAAACCGCTGAGCAAAACAAATTCT	900
CP003131.1	863175	TCAACAGATTCAACAAAAGCTACAAC TGA AAAACCAAAAACCGCTGAGCAAAACAAATTCT	863234
p65	901	TCTGAGCAATCAAGTACCGATTCTAAATCAAATAA 936	
CP003131.1	863235	TCTGAGCAATCAAGTACCGATTCTAAATCAAATAA 863270	

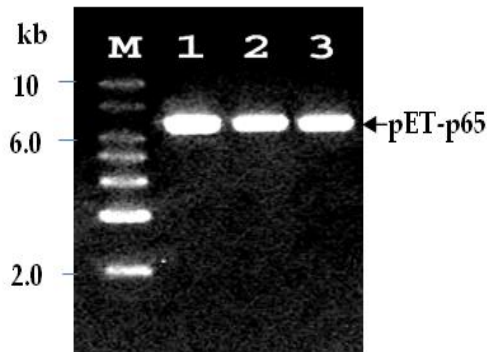
Hình 5. Kết quả giải trình tự gen p65

p65	1	MAKNFDFHPSIQGYKKIAHQLLLKLTLDQEEKDSSNAEELKNTTNFDDFDENKPTYSKVI	60
AAB67173.1	317	MAKNFDFHPSIQGYKKIAHQLLLKLTLDQEEKDSSNAEELKNTTNFDDFDENKPTYSKVI	376
p65	61	DLSVFAKSNKEFLEKLNENKQTSEFIAQKSTFDTDQEAAIKDDKRTFGNIVREIVSLPIF	120
AAB67173.1	377	DLSVFAKSNKEFLEKLNENKQTSEFIAQKSTFDTDQEAAIKDDKRTFGNIVREIVSLPIF	436
p65	121	DNFDFRELIPVKNPFVKAIINSYLGKPPAGSLIKDIEQLENKVKDYARPNIKIFDTIIDSF	180
AAB67173.1	437	DNFDFRELIPVKNPFVKAIINSYLGKPPAGSLIKDIEQLENKVKDYARPNIKIFDTIIDSF	496
p65	181	IRKMVAFFAELNTDQEIKEFKMSPQILFLTLRNAILSPPDLTKLKDSATFKILMNLKPEQ	240
AAB67173.1	497	IRKMVAFFAELNTDQEIKEFKMSPQILFLTLRNAILSPPDLTKLKDSATFKILMNLKPEQ	556
p65	241	ILTLGLGKTPSVPKPEKPKDQGSMPQTDTSQQKESGTGSDSTKATTENQKPAEQTNS	300
AAB67173.1	557	ILTLGLGKTPSVPKPEKPKDQGSMPQTDTSQQKESGTGSDSTKATTENQKPAEQTNS	616
p65	301	SEQSSTDSKSN	311
AAB67173.1	617	SEQSSTDSKSN	627

Hình 6. Trình tự amino acid suy diễn của gen mã hóa kháng nguyên p65

3.3 Tạo dòng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp PET-p65

Vector tái tổ hợp PET-p65 sau khi cấu trúc thành công được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3). Hỗn hợp biến nạp được trải trên môi trường thạch LB có bổ sung kanamycin. Những khuẩn lạc mọc được trên môi trường sàng lọc được lựa chọn ngẫu nhiên để tiến hành nuôi 37 °C qua đêm, sau đó tiến hành tách chiết, tinh sạch và kiểm tra vector tái tổ hợp. Kết quả cho thấy ở các giếng 1, 2 và 3 đều xuất hiện một vạch ADN tương ứng với kích thước khoảng 6677 bp (trong đó kích thước vector là 5741 bp). Như vậy, chúng tôi đã tạo dòng thành công chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp PET-p65 và có thể sử dụng để biểu hiện gen mã hóa p65 (Hình 7).

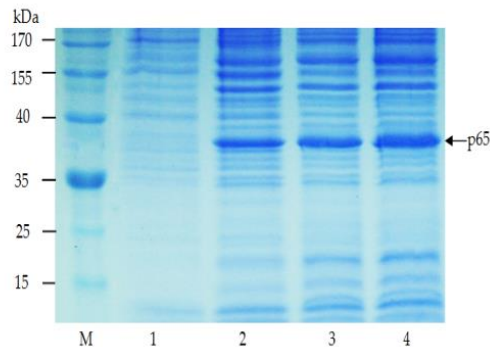


Hình 7. Điện di kiểm tra plasmid pET-p65 tái tổ hợp
M: Thang chuẩn ADN (0,5–10 kb); 1, 2 và 3: Plasmid tái tổ hợp chứa gen p65

3.4 Biểu hiện protein tái tổ hợp p65 trong vi khuẩn *E. coli*

Protein p65 tái tổ hợp được biểu hiện trong chủng *E. coli* BL21 (DE3) sau cảm ứng với 1 mM IPTG, nhiệt độ 37 °C, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Phân tích biểu hiện của p65 tái tổ hợp bằng phương pháp SDS-PAGE.

Kết quả Hình 8 cho thấy xuất hiện vạch protein đậm có kích thước khoảng 37 kD ở giếng số 2,3 và 4 (bao gồm 3,7 kDa đuôi dung hợp 6xHis của vector). Trong khi đó không xuất hiện vạch này ở mẫu đối chứng âm là chủng *E. coli* không mang vector tái tổ hợp ở giếng 1. Như vậy, sơ bộ chúng tôi có thể kết luận protein tái tổ hợp p65 của *M. hyopneumoniae* đã được biểu hiện thành công trong vi khuẩn *E. coli*. Điều này đã chứng minh qua kết quả giải trình của gen p65 và đã gắn thành công trong vector biểu hiện pET200/D-TOPO và kết quả điện di biến tính protein bằng phương pháp SDS-PAGE.



Hình 8. Kết quả biểu hiện protein tái tổ hợp p65 trong vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3)

M: Thang chuẩn protein (10–170 kDa); 1: Protein thu được từ tế bào *E. coli* không mang vector tái tổ hợp; 2,3 và 4: Protein tái tổ hợp 6xHis-p65

4 Kết luận

Chúng tôi đã tạo dòng và biểu hiện thành công gen mã hóa p65 trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3). Kết quả phân lập gen p65 của *M. hyopneumoniae* thu được đoạn ADN có chiều dài khoảng 936 bp, tương đồng 100% so với gen p65 đã được công bố trên GenBank. Trình tự này đã được gắn vào vector pET200/D-TOPO và protein dung hợp p65 có khối lượng phân tử khoảng 37 kD.

Lời cảm ơn: Đề tài được thực hiện bằng kinh phí của đề tài Khoa học công nghệ cấp Đại học Huế, mã số DHH 2017-15-06.

Tài liệu tham khảo

1. Clark L.K., Armstrong C.H., Freeman M.J., Scheidt A.B., Sands-Freeman L. and Knox K. (1991), Investigating the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd with enzootic pneumonia. *Vet Med (USA)*. 86: 543-550.

2. Liu W., Xiao S., Li M., Guo S., Li S., Luo R., Feng Z., Li B., Zhou Z., Shao G., Chen H. and Fang L. (2013), Comparative genomic analyses of *Mycoplasma hyopneumoniae* pathogenic 168 strain and its high-passaged attenuated strain. *BMC Genomics*: 1471–2164.
3. Sørensen V., Ahrens P., Barfod K., Feenstra A.A., Feld N.C., Friis N.F., Bille-Hansen V., Jensen N.E. and Pedersen M.W. (1997), *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Vet Microbiol.* 54(1): 23–34.
4. Seymour L.M., Deutscher A.T., Jenkins C., Kuit T.A., Falconer L., Minion F.C., Crossett B., Padula M., Dixon N.E., Djordjevic S.P. and Walker M.J. (2010). A processed multidomain *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin binds fibronectin, plasminogen, and swine respiratory cilia. *J. Biol. Chem*: 33971–33978.
5. Sambrook J., Russell D.W. (2001), *Molecular cloning*: A laboratory manual. 3rd Edition: A4.40-42. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. N.Y.
6. Thacker E. (2006), *Mycoplasmal diseases of swine* (Eds: Straw B. E., Zimmerman J. J., D’Allaire S., and Taylor D.J)9th edition. Blacwell Publishing Ltd., Oxford, UK: 701–717.
7. Zhang Q., Young T.F. and Ross R.F. (1995), Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infect. Immun.* 63(3): 1013–1019.

CLONING AND EXPRESSION OF GENE ENCODING PROTEIN p65 FROM *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* IN *E. COLI* BL21(DE3)

**Huynh Van Chuong^{1*}, Dang Thanh Long¹, Dinh Thi Bich Lan², Hoang Thi Kim Hong³,
Phung Thang Long², Le Duc Thao², Le Quoc Viet¹, Vo Khanh Phuoc⁴**

¹ Institute of Biotechnology, Hue University, provincial road No. 10, Phu Vang, TTHue, Vietnam

² University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung, Hue, Vietnam

³ University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue, Hue, Vietnam

⁴ Quang Nam University, 102 Hung Vuong, Quang Nam, Vietnam

Abstract. In this study, we successfully cloned and expressed the p65 gene encoding for p65 protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) isolated from pig lungs collected in Thua Thien Hue province, Vietnam. The p65 gene was amplified and cloned into pET200/D-TOPO vector and then transformed into the *E. coli* BL21 (DE3) strain. The results showed that the p65 gene segment was 936 bp, identical to the published p65 gene on GenBank (accession number: CP003131.1), encoding a polypeptide chain of 311 amino acid residues, identical to an amino acid sequence of a protein on GenBank (accession number: AAB67173.1). The denatured SDS-PAGE analysis showed a protein band of 37 kDa which corresponded to 6×His-p65 fusion protein.

Keywords: pig, p65 gene, *Mycoplasma hyopneumoniae*