

# PHÂN LẬP VÀ TẠO DÒNG GENE THERMOLABILE HEMOLYSIN CỦA VI KHUẨN *VIBRIO* TỪ CÁ HỒNG MỸ Ở THỪA THIÊN HUẾ

## Isolation and DNA cloning of thermolabile hemolysin gene of *Vibrio* bacteria from *Sciaenops ocellatus* in Thua Thien Hue

Đặng Thanh Long<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thái Hoàng<sup>2</sup>, Hoàng Thị Kim Hồng<sup>3</sup>, Lê Lý Thùy Trâm<sup>4</sup>, Phạm Thị Hải Yến<sup>5</sup>,  
Huỳnh Văn Chương<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Quỳnh Trang<sup>6</sup>, Nguyễn Văn Hiệp<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Trường Trung học phổ thông Lê Lợi, Pleiku, Gia Lai

<sup>3</sup>Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

<sup>4</sup>Trường Đại học Bách Khoa, Đại học Đà Nẵng, 54 Nguyễn Lương Bằng, Đà Nẵng, Việt Nam

<sup>5</sup>Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

<sup>6</sup>Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế, 32 Lê Lợi, Huế, Việt Nam

\* Tác giả liên hệ Đặng Thanh Long (Thư điện tử: dtlong@hueuni.edu.vn)

(Ngày nhận bài (received): 19–8–2019; Ngày chấp nhận đăng (accepted): 9–10–2019)

**Tóm tắt.** Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập và định danh được một chủng *Vibrio parahaemolyticus* 01 gây bệnh xuất huyết lở loét ở cá hồng mỹ nuôi tại Thừa Thiên Huế. Gene thermolabile hemolysin (*tlh*) mã hóa tạo kháng nguyên độc tố không bền nhiệt TLH có kích thước 1257 bp, hoàn toàn tương đồng với trình tự gene được công bố trên Genebank (mã số: AY289609.1). Gene *tlh* mã hóa tạo chuỗi polypeptide hoàn chỉnh dài 418 acid amin và hoàn toàn tương đồng với chuỗi polypeptide được công bố trên Genebank (mã số: AAP41840.1). Kết quả của chúng tôi cho thấy tiềm năng ứng dụng lớn của phương pháp PCR để xác định nhanh chóng và cung cấp thông tin về mối quan hệ di truyền và phân lập gene độc tố từ vi khuẩn *Vibrio* ở tỉnh Thừa Thiên Huế.

**Từ khóa:** gene *tlh*, thermolabile hemolysin, *Vibrio parahaemolyticus*, TLH

**Abstract.** In this study, we isolated and identified the *Vibrio parahaemolyticus* 01 strain in Thua Thien Hue province causing ulcer disease in *Sciaenops ocellatus*. The full-length of thermolabile hemolysin (*tlh*) gene (1257 bp), encoding antigen thermolabile hemolysin toxin (TLH) of the *Vibrio sp.* was cloned and sequenced successfully. The sequence analysis of gene cloned shows a complete similarity to the *Vibrio parahaemolyticus* strain (Genbank: AY289609.1). Gene *tlh* encodes a complete polypeptide sequence of 418 amino acids and completely consistent with polypeptide chains published in Genebank (accession number: AAP41840.1). Our findings show a high potential of the PCR-based method for rapid identification and providing genetic relationship information and isolate the toxin gene from *Vibrio* bacteria in Thua Thien Hue province.

**Keywords:** gene *tlh*, thermolabile hemolysin, *Vibrio parahaemolyticus*, TLH

## 1 Đặt vấn đề

Bệnh xuất huyết lở loét ở cá là một bệnh rất nguy hiểm, lây lan nhanh và xuất hiện tại nhiều nước trên thế giới. Nguyên nhân gây bệnh là do nấm, virus, ký sinh trùng và nguyên nhân gây bệnh thứ cấp là vi khuẩn. Đến nay, đã có khoảng 24 quốc gia trên thế giới thông báo sự xuất hiện bệnh xuất huyết lở loét và tập trung chủ yếu ở Bắc Mỹ, Nam Châu Phi, Châu Á và Úc. Dấu hiệu đặc trưng của bệnh là các vết loét nghiêm trọng ở ngoài da, trên đầu, giữa cơ thể và trên các vùng lưng. Cá có thể chết trong vòng một tuần sau khi bị nhiễm bệnh. Theo ước tính của Ngân hàng thế giới năm 1997, tổn thất do dịch bệnh gây ra cho ngành nuôi trồng thủy sản xấp xỉ 3 tỷ đô la Mỹ [1].

Các loài *Vibrio* chính gây bệnh lở loét ở cá trên thế giới bao gồm *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus* [2]. Căn bệnh này liên quan đến hơn 100 loài cá [3]. Chúng gây bệnh bằng cách sản sinh ra các độc tố hay nội độc tố với lượng lớn. Bệnh thể hiện với triệu chứng nhiễm trùng huyết, xuất huyết và tổn thương da. Do tính chất bền vững của bộ gen vi khuẩn *Vibrio*, thường xuyên xảy ra hiện tượng chuyển gen ngang, trong khi đó trong môi trường biển ranh giới loài rất hẹp [4]. Do đó, việc xác định các loài liên quan đến *Vibrio* phân lập từ môi trường biển đôi khi rất khó khăn [5]. Độc tố hay nội độc tố được cho là các phân tử chịu trách nhiệm về độc lực của các loài *Vibrio*, nhưng chưa có nghiên cứu nào về mô học đề cập đến những giả thuyết này [6].

Hemolysin, là một độc tố có trong vi khuẩn *Vibrio* sp. Chúng phá vỡ màng hồng cầu và giải phóng hemoglobin, được cho là độc tố phân bố rộng rãi nhất trong số *Vibrio* sp. gây bệnh và có vai trò khác nhau trong quá trình lây nhiễm [7]. Tồn tại 5 họ hemolysin đại diện trong *Vibrio* sp., trong đó có hai họ hemolysin không bền nhiệt (haemolysin thermolabile – TLH) và hemolysin bền nhiệt (thermostable direct hemolysin – TDH) đã được nhiều tác giả quan tâm nghiên cứu [8].

Độc tố TLH là độc tố không bền nhiệt. Độc tố này được tìm thấy trong *V. parahaemolyticus* và một số loài *Vibrio* khác [9–11]. Độc tố TLH phụ thuộc vào lecithin (LDH), không bền nhiệt và bị phân hủy ở 60 °C trong 10 phút [9], có hoạt tính phospholipase A2/lysophospholipase. Gene haemolysin thermolabile (*tlh*) mã hóa tạo kháng nguyên độc tố không bền nhiệt TLH chứa ORF là 1254 bp và tạo ra tiền protein và protein hoàn chỉnh lần lượt mang 418 và 398 phân tử axit amin với khối lượng phân tử tương ứng tương ứng 47,5 và 45,3 kDa [11]. Hàm lượng G + C của gene *tlh* là 47,6%, gần như giống với hệ gen *V. parahaemolyticus*. Hai codon methionine (ATG) được đặt gần 5'-end [10], nhưng vai trò làm codon khởi đầu sao chép không thật sự rõ ràng.

Mục đích của nghiên cứu này là phân lập, định danh và tạo dòng thành công gene thermolabile hemolysin mã hóa tạo kháng nguyên độc tố không bền nhiệt TLH trong tế bào *E. coli* TOP10 làm nguyên liệu cho những nghiên cứu tiếp theo.

## 2 Nguyên liệu và phương pháp

### 2.1 Nguyên liệu

Cá hồng mỹ có biểu hiện xuất huyết lở loét thu ở huyện Phong Điền, Thừa Thiên Huế.

Chúng vi khuẩn *E. coli* TOP10, BL21(DE3), vector pGEM®-T Easy (Invitrogen), Kit tinh sạch gel: Kit Isolate II PCR and Gel (Bioline) và Kit tách và tinh sạch plasmid tái tổ hợp (EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps Kit, BS6141 (Bio Base INC)).

Một số hóa chất thông dụng khác: NaCl (Merck); CTAB (Trimethyl Ammonium Bromide, Merck); ampiciliin (Sigma); Peptone (Difco); môi trường Thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) (Merck); Tris-HCl (Bio Base INC); EDTA (Bio Base INC); Proteinase K (20 mg/mL; Sigma); Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Bio Base INC); Chloroform (Merck); Isoamyl alcohol (Merck); Phenol (Merck); Ethyidium bromide (Merck).

## 2.2 Phương pháp

### Phân lập vi khuẩn *Vibrio* sp.

Cá hồng mỹ có biểu hiện xuất huyết lở loét được rửa sạch bằng nước cất vô trùng. Dùng dao vô trùng lấy 100 mg phần cơ cá có chứa vết xuất huyết lở loét cho vào ống nghiệm và nghiền mịn, sau đó đồng nhất trong 5 mL môi trường peptone kiềm lỏng (APW, 1% peptone (Difco) and 1% NaCl, pH 8,6) và ủ ở 37 °C trong 24 giờ. Huyền dịch chứa vi khuẩn sẽ được dàn đều trên đĩa thạch chứa môi trường Thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) và tiếp tục ủ ở 37 °C trong 24 giờ [12]. Các khuẩn lạc đơn mọc trên môi trường thạch TCBS được chọn lọc và chuyển sang ống nghiệm chứa 5 mL môi trường lỏng APW bằng que tăm vô trùng và ủ 35 °C trong 18 giờ [13]. Huyền dịch của 3 khuẩn lạc đơn khác nhau có biểu hiện màu xanh trên môi trường TCBS được chọn lọc ngẫu nhiên để tiến hành tách chiết DNA tổng số, định danh và phân lập gene *tlh*.

### Tách chiết DNA

DNA tổng số từ vi khuẩn *Vibrio* sp. được tách chiết theo mô tả của Panicker và cộng sự có sự thay đổi cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm [14]. Sinh khối tế bào vi khuẩn *Vibrio* sp. được thu nhận từ 1 mL huyền dịch nuôi cấy ở 35 °C trong 18 giờ bằng máy ly tâm lạnh (Máy ly tâm lạnh, Model: 5417R) ở 15.000 vòng/phút trong hai phút. Sau đó tái huyền phù trong 500 µL đệm TE (10 mM Tris-HCl, 1,0 mM EDTA, pH 8). Tế bào được phá vỡ bằng cách bổ sung thêm 30 µL sodium dodecyl sulfate (SDS) 10% (khối lượng/thể tích) và 5 µL dung dịch proteinase K (20 mg/mL; Sigma). Sau một giờ ủ, tiếp tục bổ sung 100 µL NaCl 5 M và 80 µL Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) hòa tan trong NaCl ((10% CTAB trong 0,7 M NaCl) để tạo phức với polysaccharides. DNA tổng số được tinh sạch nhằm loại bỏ protein và các thành phần tế bào khác bằng cách bổ sung một thể tích tương đương (715 µl) hỗn hợp chloroform-isoamyl alcohol (24:1) và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút. Pha lỏng ở phía trên được chuyển sang ống nghiệm (1,5 mL) mới và tiếp tục bổ sung một thể tích tương đương hỗn hợp phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút. Dùng pipette hút pha lỏng ở phía trên chuyển vào ống nghiệm (1,5 mL) mới và tiếp tục bổ sung một thể tích của isopropanol giữ ở -20 °C trong 30 phút. Kết tủa được thu nhận bằng ly tâm 13.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4 °C và rửa lại ba lần với 70% ethanol (thể tích/thể tích), sau đó sấy khô tủa DNA ở nhiệt độ phòng. Hòa tan kết tủa trở lại với 50 µL trong đệm TE. DNA tổng số của vi khuẩn *Vibrio* sp. được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8% với điện thế cung cấp là 80 V trong đệm TAE (40 mM Tris pH: 7,6, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA) với thuốc nhuộm ethyidium bromide (EtBr) (0,5 µg/L).

### Định danh vi khuẩn *Vibrio* sp. bằng sinh học phân tử

Vi khuẩn *Vibrio* sp. phân lập được từ mẫu bệnh phẩm xuất huyết lở loét ở cá hồng mỹ tiếp tục được định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử dựa trên sự tương đồng gene 16S-rRNA. DNA của vi khuẩn được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 16S-rRNA (16S-rRNA-F: 5'-CGTGCCAGCAGCCGCGGTAA-3' và 16S-rRNA-R: 5'-GCCCCGGAACGTATTCACCG-3') để khuếch đại đoạn gen 16S-rRNA [15]. Cây phát sinh di truyền được xây dựng bằng thuật toán Maximum Likelihood dựa trên mô hình Tamura-Nei [16] trên phần mềm MEGA7 [17].

### Phương pháp PCR phân lập gene *thermolabile hemolysin*

DNA tổng số thu được sau khi tách chiết từ vi khuẩn *Vibrio* sp. được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR phân lập gene *tlh* mã hóa tạo kháng nguyên độc tố không bền nhiệt TLH với cặp mồi đặc hiệu được thiết kế dựa trên trình tự nucleotide được đăng ký trên Genbank có mã số AY289609.1 thông qua phần mềm Primer3plus [18]. Thành phần nucleotide của cặp mồi đặc hiệu cho gene: VptlhF: 5'-ATGATGAAAAACAATCACAC-3'; VptlhR: 5'-TTAGAAACGGTACTCGGCTAAGTTG -3'. Thành phần phản ứng PCR gồm có: 50 ng DNA khuôn, 12,5  $\mu$ L 2 $\times$ PCR master mix (2,4 mM dNTP mỗi loại, 0,3 đơn vị *Taq* DNA polymerase, 10 pmol VptlhF, 10 pmol VptlhR và bổ sung nước cất vô trùng để đạt thể tích phản ứng là 25  $\mu$ L. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy luân nhiệt MJ mini™ Personal Thermal cycler, BioRad với chu trình nhiệt như sau: biến tính ở 95 °C/5 phút, 30 chu kỳ tiếp theo: 95 °C/45 giây, 51 °C/1 phút, 72 °C/1 phút và kéo dài mạch ở 72 °C/10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%, nhuộm màu bằng ethidium bromide (EtBr 0,5  $\mu$ g/L) và phân tích hình ảnh điện di bằng hệ thống DyNA Light, Dual Intensity UV Transilluminator (Labnet).

### Phương pháp tạo dòng gene

Sản phẩm PCR sau khi được tinh chế bằng Kit Isolate II PCR và gel sẽ được gắn vào vector pGEM®-T Easy theo phương pháp tạo dòng TA để tạo thành vector tái tổ hợp pGEM/*tlh*. Thành phần phản ứng gắn được chúng tôi tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất bao gồm: 50 ng vector pGEM®-T Easy, 5  $\mu$ L đệm gắn 2X, 3 đơn vị enzyme T<sub>4</sub> DNA ligase, 62,6 ng sản phẩm PCR sau khi tinh sạch và bổ sung nước vô trùng để đạt thể tích cuối cùng 10  $\mu$ L, phản ứng được ủ qua đêm ở 4 °C. Sản phẩm plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10 bằng phương pháp hóa biến nạp. Tế bào biến nạp được chọn lọc bằng phương pháp khuẩn lạc xanh-trắng theo cơ chế X-gal và kháng sinh. Khuẩn lạc màu trắng được chọn lọc để kiểm tra sự hiện diện của gene *tlh* bằng phản ứng PCR với cặp mồi M13 (M13F: 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' và M13R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') được thiết kế sẵn hao đầu của vector pGEM®-T Easy.

Các dòng khuẩn lạc dương tính được nuôi tăng sinh, thu sinh khối tế bào và tách chiết, tinh chế plasmid tái tổ hợp theo Kit plasmid EZ-10, BS6141 (BioBase INC). Gene *tlh* được phân tích trình tự bằng phương pháp dideoxy terminator trên máy ABI 3031 Analysis ở công ty Maccrogen, Hàn Quốc, hiệu chỉnh bằng phần mềm BioEdit và so sánh mức độ tương đồng với trình tự đã được công bố trên ngân hàng gene NCBI bằng chương trình BLAST.

### 3 Kết quả và thảo luận

#### 3.1 Kết quả phân lập vi khuẩn *Vibrio*

Kết quả phân lập vi khuẩn *Vibrio* thể hiện ở Hình 1 cho thấy có hơn 100 khuẩn lạc đơn tách rời nhau và thể hiện màu xanh trên môi trường TCBS. Những khuẩn lạc đơn này được chúng tôi chọn lọc ngẫu nhiên để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo (Hình 1).

#### 3.2 Tách chiết DNA tổng số

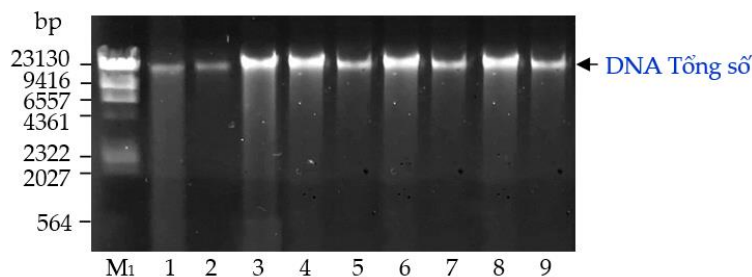
DNA tổng số của 3 khuẩn lạc đơn màu xanh trên môi trường TCBS sau khi tách chiết bằng phương pháp CTAB theo mô tả của Panicker [14] sẽ được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 0,8%. Kết quả ở Hình 2 cho thấy DNA thu được có chất lượng tốt, nồng độ cao, một băng DNA rõ nét, đồng đều và sạch, không bị đứt gãy. Nguyên liệu DNA này có thể sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

#### Kết quả định danh vi khuẩn

DNA tổng số của dòng khuẩn lạc đơn 01 trong 03 dòng khuẩn lạc đơn màu xanh chọn lọc ngẫu nhiên trên môi trường TCBS được sử dụng định danh loài dựa trên sự tương đồng gene 16S-rRNA. Đã thu được đoạn gene 16S-rRNA của dòng khuẩn lạc đơn 01 có kích thước 876 bp (Hình 3). Cây phát sinh di truyền hiển thị có

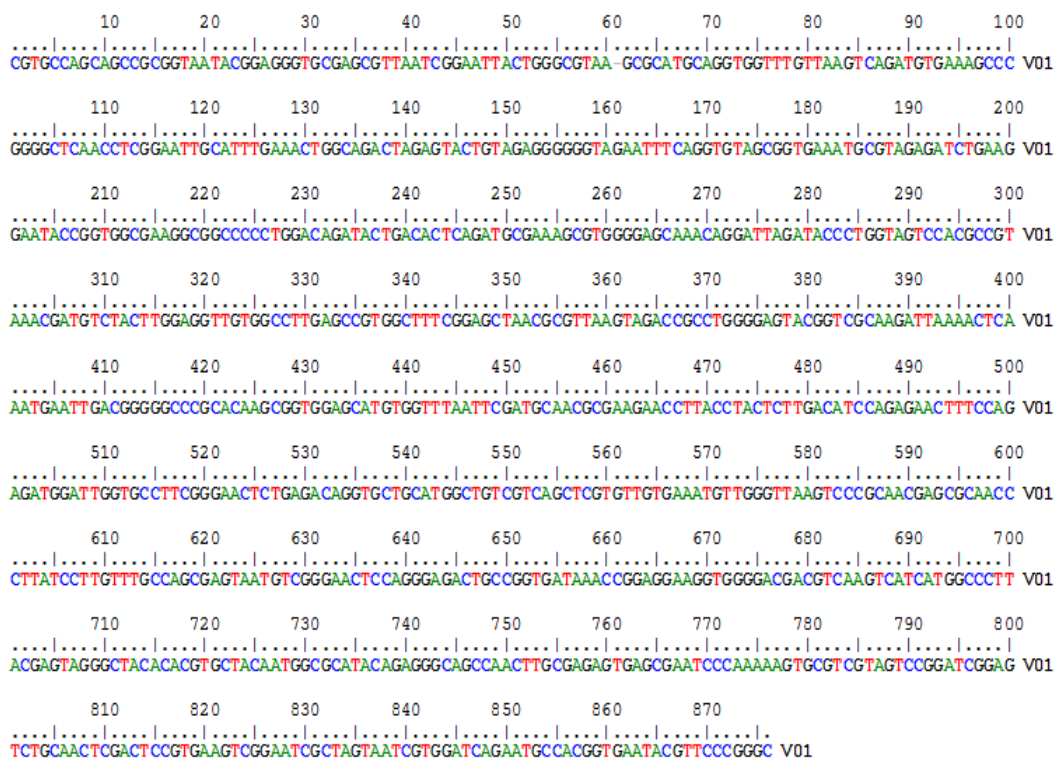


Hình 1. Vi khuẩn *Vibrio* mọc trên môi trường TCBS agar

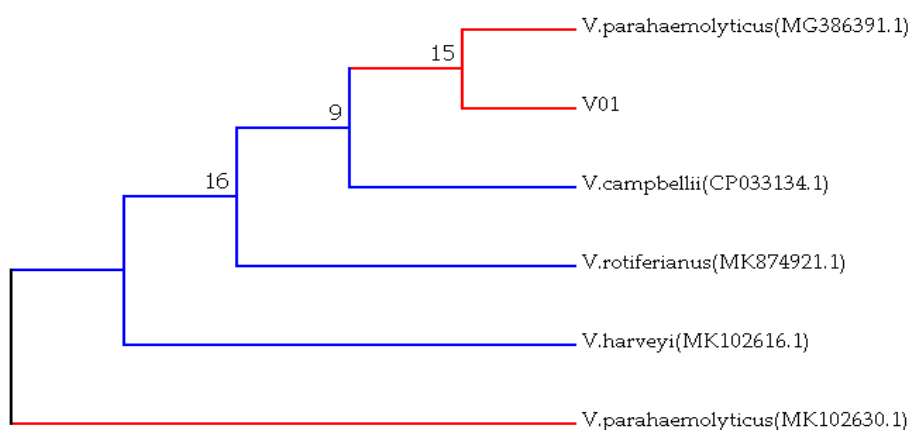


Hình 2. Kết quả tách chiết DNA tổng số trên gel agarose 0,8%. M<sub>1</sub>: khối lượng thang chuẩn DNA (Lambda DNA/HindIII Marker ( 125–23130 bp), Biotols); 1–3: DNA tổng số lặp lại 3 lần tách chiết của khuẩn lạc đơn 01, 4–6: DNA tổng số lặp lại 3 lần tách chiết của khuẩn lạc đơn 02 và 7–9: DNA tổng số lặp lại 3 lần tách chiết của khuẩn lạc đơn 03.

tính hợp lý cao nhất (-1047,42) được xây dựng dựa trên thuật toán Maximum Likelihood dựa trên mô hình Tamura-Nei [16] với một số loài vi khuẩn *Vibrio* spp. được công bố trên ngân hàng Genbank sử dụng làm đối chiếu. Kết quả cho thấy dòng khuẩn lạc đơn 01 mà chúng tôi phân lập được nằm cùng nhánh và có quan hệ gần gũi với loài vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* (mã số: MG386391.1) (Hình 4). Như vậy, dòng khuẩn lạc đơn mà chúng tôi phân lập được trên vết xuất huyết lở loét ở cá hồng mỹ thuộc loài *Vibrio parahaemolyticus*. Loài vi khuẩn này được chúng tôi ký hiệu là *Vibrio parahaemolyticus* 01 (Hình 4).



Hình 3. Trình tự nucleotide đoạn gene 16S-rRNA phân lập được trên dòng khuẩn lạc đơn



Hình 4. Phân tích phát sinh di truyền bằng phương pháp Maximum Likelihood dựa trên mô hình Tamura-Nei [16] trên phần mềm MEGA7 [17]

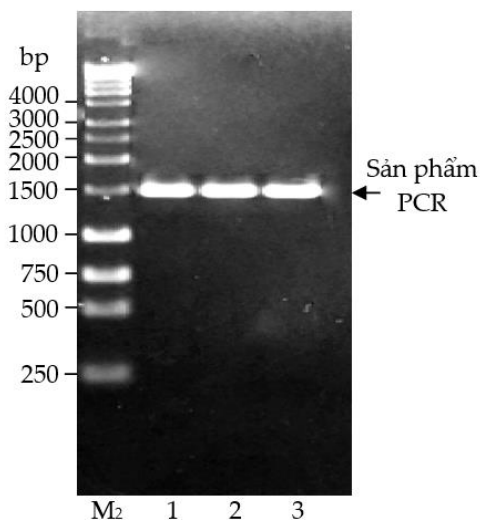
### 3.2 Phân lập gene *thermolabile hemolysin*

Gene *tlh* mã hóa tạo kháng nguyên độc tố không bền nhiệt TLH của vi khuẩn *Vibrio* sp. được phân lập bằng phản ứng PCR trên máy luân nhiệt MJ mini™ Personal Thermal cycler, BioRad. Kết quả cho thấy xuất hiện một băng DNA duy nhất, rõ, nồng độ cao có kích thước khoảng 1257 bp. Điều này cho chúng tôi thấy rằng từ khâu thiết kế mồi cho đến quá trình thực hiện phản ứng PCR đều diễn ra chính xác (Hình 5).

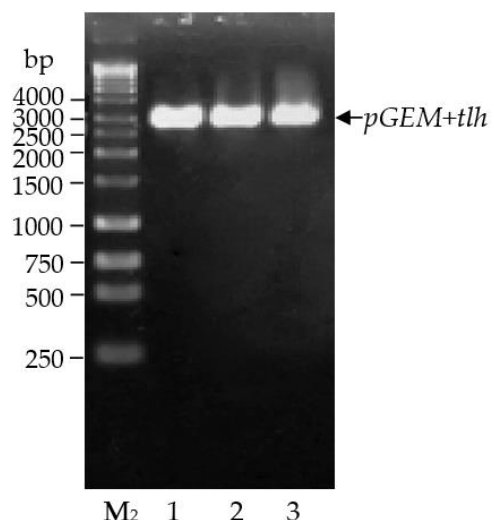
### 3.3 Kết quả tạo dòng và phân tích trình tự gene mã hóa kháng nguyên độc tố không bền nhiệt TLH

Sản phẩm PCR thu được sau khi tinh sạch (gene *tlh*) có gắn thêm adenine (dA) vào đầu 3' (do đặc tính của enzyme Taq DNA polymerase) nhằm tạo liên kết bổ sung với thymidine (dT) đã được thiết kế trong vector pGEM®-T Easy bằng phương pháp tạo dòng (TA-cloning). Kết quả gắn vào vector và biến nạp vào tế bào vật chủ *E. coli* TOP10 thể hiện thông qua tách chiết plasmid tái tổ hợp và điện di trên gel agarose 1% trên Hình 5 cho thấy chỉ có một băng duy nhất, đậm, rõ nét với kích thước khoảng 4272 bp (bao gồm kích thước của vector pGEM®-T Easy là 3015 bp và kích thước của gene *tlh* khoảng 1257 bp) (Hình 6). Qua đây có thể kết luận rằng chúng tôi đã gắn thành công gene *tlh* vào vector pGEM®-T Easy và biến nạp được vào tế bào vật chủ *E. coli* chủng TOP10. Plasmid tái tổ hợp này được chúng tôi gửi phân tích trình tự nucleotide ở Công ty Maccrogen, Hàn Quốc.

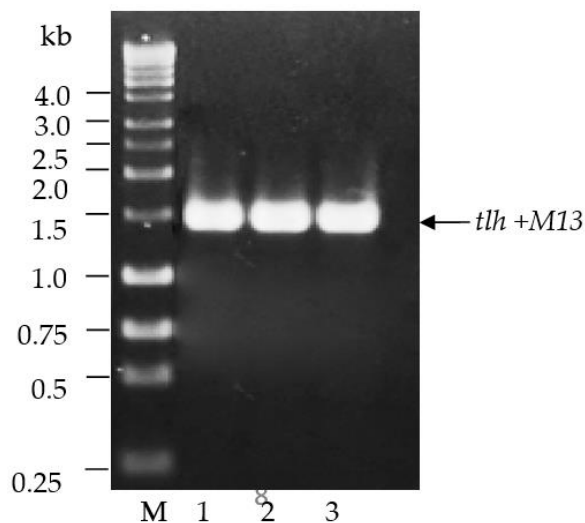
Sự hiện diện của gene *tlh* trong các tế bào *E. coli* TOP10 được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR gián tiếp thông qua cặp mồi M13. Kết quả cho thấy đã xuất hiện băng DNA có kích thước khoảng (1500 bp) (bao gồm kích thước của gene 1257 bp và một đoạn khoảng 200 bp nằm trên vector pGEM®-T Easy) (Hình 7).



**Hình 5.** Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gene *tlh*. M2: khối lượng thang chuẩn DNA (250–10.000 bp, Promega), NC: đối chứng âm. 1, 2 và 3: sản phẩm PCR với 3 lần lặp lại



**Hình 6.** Ảnh điện di kiểm tra plasmid pGEM/*tlh* tái tổ hợp. M2: khối lượng thang chuẩn DNA (250–10.000 bp, Promega), 1–3: sản phẩm plasmid tái tổ hợp chứa gene *tlh* tách từ 3 khuẩn lạc



**Hình 7.** Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR với cặp mồi M13. M: Thang chuẩn DNA (250–10.000 bp, Promega); 1, 2 và 3: sản phẩm PCR

Kết quả phân tích trình tự cho thấy đoạn gene phân lập được có kích thước 1257 bp (bao gồm cả bộ ba mở đầu ATG và bộ ba kết thúc TAA) và tương đồng 100% đối với trình tự nucleotide công bố trên ngân hàng gene thế giới GenBank với mã số AY289609.1. Trình tự này mã hóa tạo một chuỗi peptide suy diễn hoàn chỉnh và liên tục bao gồm 418 amino acid (không bao gồm bộ ba kết thúc TAA) và tương đồng 100% với trình tự amino acid công bố với mã số AAP41840.1 (Hình 8). Kết quả thu của chúng tôi phù hợp với kết quả nghiên cứu của Shinoda và cộng sự [11]. Như vậy, chúng tôi có thể khẳng định rằng đã tách dòng thành công gene *tlh* mã hóa kháng nguyên độc tố không bền nhiệt TLH của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* 01 là một trong những tác nhân gây nên bệnh xuất huyết lở loét trên các hồng mỳ thu tại Thừa Thiên Huế.

#### 4 Kết luận

Chúng tôi phân lập và định danh được một dòng vi khuẩn *Vibrio* trên vết xuất huyết lở loét ở cá hồng mỳ thu tại huyện Phong Điền, Thừa Thiên Huế dựa trên sự tương đồng của vùng gen 16S-rRNA thuộc loài *Vibrio parahaemolyticus* và được chúng tôi ký là *Vibrio parahaemolyticus* 01. Chúng tôi đã phân lập thành công gene *tlh* mã hóa tạo kháng nguyên độc tố không bền nhiệt TLH của *Vibrio parahaemolyticus* 01 gây bệnh xuất huyết lở loét ở cá hồng mỳ. Gene mã hóa tạo kháng nguyên độc tố không bền nhiệt TLH có kích thước 1257 bp (bao gồm bộ ba mở đầu ATG và bộ ba kết thúc TAA), vùng gene này mã hóa tạo thành chuỗi peptide hoàn chỉnh và liên tục gồm 418 amino acid. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi sẽ làm nguyên liệu để tiến hành nghiên cứu biểu hiện gene *tlh* mã hóa tạo kháng nguyên độc tố không bền nhiệt TLH trong vật chủ thích hợp sản xuất vaccine/kháng thể sử dụng trong phòng trị bệnh do vi khuẩn *Vibrio* gây ra xuất huyết lở loét trên cá hồng mỳ, góp phần giảm thiểu thiệt hại kinh tế cho người nuôi trồng thủy sản.

**Lời cảm ơn:** Xin trân trọng cảm ơn Bộ Giáo dục Đào tạo đã tài trợ cho nghiên cứu này thông qua đề tài khoa học công nghệ cấp Bộ, mã số CT-2018-DHH-05.



CDS: Putative 1	1	M M K K T I T L L T A L L P L A S A V A	
<i>tlh</i>	1	ATGATGAAAAAACAATCACACTATTACTGCAATTAAGTCCAGTTCCTGCTGAGTTGCC	60
AY289609.1	1	ATGATGAAAAAACAATCACACTATTACTGCAATTAAGTCCAGTTCCTGCTGAGTTGCC	60
CDS:thermolabile hem	1	M M K K T I T L L T A L L P L A S A V A	
CDS: Putative 1	21	E E P T L S P E M V S A S E V I S T Q E	
<i>tlh</i>	61	GAAGAGCCAACTTATCAACAGAAATGGTTTCAAGGCTGAAAGTATCAGCAAGCAAGAA	120
AY289609.1	61	GAAGAGCCAACTTATCAACAGAAATGGTTTCAAGGCTGAAAGTATCAGCAAGCAAGAA	120
CDS:thermolabile hem	21	E E P T L S P E M V S A S E V I S T Q E	
CDS: Putative 1	41	N Q T Y T Y V R C W Y R T S Y S K D D P	
<i>tlh</i>	121	AACCAAACTATACCTATGTTGCTGTGGTATCGACCAAGCTACTCGAAAGATGATCGG	180
AY289609.1	121	AACCAAACTATACCTATGTTGCTGTGGTATCGACCAAGCTACTCGAAAGATGATCGG	180
CDS:thermolabile hem	41	N Q T Y T Y V R C W Y R T S Y S K D D P	
CDS: Putative 1	61	A T D W E W A K N E D G S Y F T I D G Y	
<i>tlh</i>	181	GGACCGATTGGGAATGGCAAAAAAGAGATGGTACTACTCACCATTGAGCGCTAC	240
AY289609.1	181	GGACCGATTGGGAATGGCAAAAAAGAGATGGTACTACTCACCATTGAGCGCTAC	240
CDS:thermolabile hem	61	A T D W E W A K N E D G S Y F T I D G Y	
CDS: Putative 1	81	W W S S V S F K N M F Y T N T S Q N V I	
<i>tlh</i>	241	TGGTGGAGCTCGTTTCACTTTAAAAACATGTTCTACACCAAGCAAGCTCGAAAGGTTATC	300
AY289609.1	241	TGGTGGAGCTCGTTTCACTTTAAAAACATGTTCTACACCAAGCAAGCTCGAAAGGTTATC	300
CDS:thermolabile hem	81	W W S S V S F K N M F Y T N T S Q N V I	
CDS: Putative 1	101	R Q R C E A T L D L A N E N A D I T F F	
<i>tlh</i>	301	CGTCAGCGTTGTGAAGCCACATTAGATTTGGGGAACGGAAGCAGACATTAGCTTCTTC	360
AY289609.1	301	CGTCAGCGTTGTGAAGCCACATTAGATTTGGGGAACGGAAGCAGACATTAGCTTCTTC	360
CDS:thermolabile hem	101	R Q R C E A T L D L A N E N A D I T F F	
CDS: Putative 1	121	A A D N R F S Y N H T I W S N D A A M Q	
<i>tlh</i>	361	GGCGTGACAAATGCTTTCATACAAACACAGATCTGGAACAAAGCAGCAATGGAG	420
AY289609.1	361	GGCGTGACAAATGCTTTCATACAAACACAGATCTGGAACAAAGCAGCAATGGAG	420
CDS:thermolabile hem	121	A A D N R F S Y N H T I W S N D A A M Q	
CDS: Putative 1	141	P D Q I N K V V A L G D S L S D T G N I	
<i>tlh</i>	421	CCAGATCAAAATCAACAAATGGTTGCACTGGTACAGCTTGTCTGATACAGCAACATC	480
AY289609.1	421	CCAGATCAAAATCAACAAATGGTTGCACTGGTACAGCTTGTCTGATACAGCAACATC	480
CDS:thermolabile hem	141	P D Q I N K V V A L G D S L S D T G N I	
CDS: Putative 1	161	F N A S Q W R E P N P N S W F L G H F S	
<i>tlh</i>	481	TTTAAGCCATCAAAATGGCTTCCCTAACCCGAAACAGCTGGTCTTAGTCACTTCTCC	540
AY289609.1	481	TTTAAGCCATCAAAATGGCTTCCCTAACCCGAAACAGCTGGTCTTAGTCACTTCTCC	540
CDS:thermolabile hem	161	F N A S Q W R E P N P N S W F L G H F S	
CDS: Putative 1	181	N G F V W T E Y I A K A K N L P L Y N W	
<i>tlh</i>	541	AACGTTTGTGTGGACAGATACATGGCCAAAAGCAAGCAAGCTTCCGCTTACAACTGG	600
AY289609.1	541	AACGTTTGTGTGGACAGATACATGGCCAAAAGCAAGCAAGCTTCCGCTTACAACTGG	600
CDS:thermolabile hem	181	N G F V W T E Y I A K A K N L P L Y N W	
CDS: Putative 1	201	A V G G A A G E N Q Y I A L T G V G E Q	
<i>tlh</i>	601	GCAGTTGGGGGGGGGCTGGTGGAGAACAAATACATCGGCTAACAGGGGTTGGTGGCAA	660
AY289609.1	601	GCAGTTGGGGGGGGGCTGGTGGAGAACAAATACATCGGCTAACAGGGGTTGGTGGCAA	660
CDS:thermolabile hem	201	A V G G A A G E N Q Y I A L T G V G E Q	
CDS: Putative 1	221	V S S Y L T Y A K L A K N Y K P A N T L	
<i>tlh</i>	661	GTTTCTTGACTAATACCTAGCCAAAAGTGGGGAAGACTACAAACAGCAACCACTGG	720
AY289609.1	661	GTTTCTTGACTAATACCTAGCCAAAAGTGGGGAAGACTACAAACAGCAACCACTGG	720
CDS:thermolabile hem	221	V S S Y L T Y A K L A K N Y K P A N T L	
CDS: Putative 1	241	F T L E F G L N D F M N Y N R G V P E V	
<i>tlh</i>	721	TTTACCTTGAATGTTGTTGATGACTTCATGAACTACAAAGCTGGCTTCCAGAAAGT	780
AY289609.1	721	TTTACCTTGAATGTTGTTGATGACTTCATGAACTACAAAGCTGGCTTCCAGAAAGT	780
CDS:thermolabile hem	241	F T L E F G L N D F M N Y N R G V P E V	
CDS: Putative 1	261	K A D Y A E A L I R L T D A G A K N F H	
<i>tlh</i>	781	AAAGCGATATGCGAGCACTATGCGAGTTCGAGCGAGTTCGAGCTTCCAGTTCGCTG	840
AY289609.1	781	AAAGCGATATGCGAGCACTATGCGAGTTCGAGCGAGTTCGAGCTTCCAGTTCGCTG	840
CDS:thermolabile hem	261	K A D Y A E A L I R L T D A G A K N F H	
CDS: Putative 1	281	L M T L P D A T K A P Q F K Y S T Q E E	
<i>tlh</i>	841	TTGATGCACTGCGAGCGCGAGGAAAGGCTCAGTTAAGTACTACAGCAAGAGAG	900
AY289609.1	841	TTGATGCACTGCGAGCGCGAGGAAAGGCTCAGTTAAGTACTACAGCAAGAGAG	900
CDS:thermolabile hem	281	L M T L P D A T K A P Q F K Y S T Q E E	
CDS: Putative 1	301	I D K I R A K V L E M N E F I K A Q A M	
<i>tlh</i>	901	ATCGACAAAATTCGTGGGAAAGTCTGAGATGAAGCTTCATCAAGGCTCAAGCGATG	960
AY289609.1	901	ATCGACAAAATTCGTGGGAAAGTCTGAGATGAAGCTTCATCAAGGCTCAAGCGATG	960
CDS:thermolabile hem	301	I D K I R A K V L E M N E F I K A Q A M	
CDS: Putative 1	321	Y Y K A Q G Y D I T L F D T H A L F E T	
<i>tlh</i>	961	TACTACAAAGCCAGGTTAAGCATCACCTGTTGATATCAGCCCTGTTGTTGGAGAGC	1020
AY289609.1	961	TACTACAAAGCCAGGTTAAGCATCACCTGTTGATATCAGCCCTGTTGTTGGAGAGC	1020
CDS:thermolabile hem	321	Y Y K A Q G Y D I T L F D T H A L F E T	
CDS: Putative 1	341	L T S A P E E H G F V N A S D P C L D I	
<i>tlh</i>	1021	CTAATCTTCCGCCAGAAAGCAAGGTTTCTGGAACCGGAGCGATCCTTGTGGACATC	1080
AY289609.1	1021	CTAATCTTCCGCCAGAAAGCAAGGTTTCTGGAACCGGAGCGATCCTTGTGGACATC	1080
CDS:thermolabile hem	341	L T S A P E E H G F V N A S D P C L D I	
CDS: Putative 1	361	N R S S S V D Y M Y T H A L R S E C A A	
<i>tlh</i>	1081	AAAGCGTATCCTGCTGCTACTACTGTACACCCAGCCATTCGCTCTGAGTGTGGGGC	1140
AY289609.1	1081	AAAGCGTATCCTGCTGCTACTACTGTACACCCAGCCATTCGCTCTGAGTGTGGGGC	1140
CDS:thermolabile hem	361	N R S S S V D Y M Y T H A L R S E C A A	
CDS: Putative 1	381	S G S E K F V F W D V T H S P T A T S E	
<i>tlh</i>	1141	TCTGTGCTGAGAAATTTGTTCTGGAATGTCAGCCAGCAACAGCAACTACCCG	1200
AY289609.1	1141	TCTGTGCTGAGAAATTTGTTCTGGAATGTCAGCCAGCAACAGCAACTACCCG	1200
CDS:thermolabile hem	381	S G S E K F V F W D V T H S P T A T S E	
CDS: Putative 1	401	Y V A E K M L E S S N N L A E Y R F	
<i>tlh</i>	1201	TATGTTGCAGAGAAATGCTGAAAGTAAACAACCTTAGCGAGTACCGTTCTAA	1257
AY289609.1	1201	TATGTTGCAGAGAAATGCTGAAAGTAAACAACCTTAGCGAGTACCGTTCTAA	1257
CDS:thermolabile hem	401	Y V A E K M L E S S N N L A E Y R F	

Hình 8. Mức độ tương đồng trình tự nucleotide giữa gene *tlh* đã phân lập và gene *tlh* được công bố trên Genbank (AY289609.1) và amino acid suy diễn của nó (AAP41840.1)

## Tài liệu tham khảo

1. Subasinghe RP, Bondad-Reantaso MG, McGladdery SE. Aquaculture development, health and wealth. 2001 In: Aquaculture in the Third Millennium. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium ed., Subasinghe RP, Bueno P, Phillips MJ, Hough C, McGladdery SE, et al., (Eds.) Rome, Italy: NACA, Bangkok and FAO, 167-91. <http://www.fao.org/3/ab412e/ab412e09.htm>
2. Chatterjee S, Haldar S. Vibrio Related Diseases in Aquaculture and Development of Rapid and Accurate Identification Methods. Journal of Marine Science: Research&Development. 2012;s1. <https://doi.org/10.4172/2155-9910.s1-002>
3. John KR, George MR. Viruses associated with epizootic ulcerative syndrome: an update. Indian Journal of Virology. 2012;23(2):106–13. <https://dx.doi.org/10.1007%2Fs13337-012-0108-x>
4. Fraser C, Hanage WP, Spratt BG. Recombination and the nature of bacterial speciation. Science. 2007;26:476-80. <https://doi.org/10.1126/science.1127573>
5. Egidius E. Vibriosis : pathogenicity and pathology. A review Aquaculture. 1987;67:15-28. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90004-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90004-4)
6. Hendrikson RG, Zenoble RD. Vibriosis in fish : a review. Iowa State University Veterinarian. 1983;45:25-8. [https://lib.dr.iastate.edu/iowastate\\_veterinarian/vol45/iss1/5](https://lib.dr.iastate.edu/iowastate_veterinarian/vol45/iss1/5)
7. Shinoda S. Protein toxins produced by pathogenic vibrios. Journal of natural toxins. 1999;8:259-69.
8. Zhang XH, Austin B. Haemolysins in *Vibrio* species. Journal of Applied Microbiology. 2005;98:1011-19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02583.x>
9. Taniguchi H, Ohta H, Ogawa M, Mizuguchi Y. Cloning and expression of *Escherichia coli* of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin genes. Journal of Bacteriology. 1985;162:510-15.
10. Taniguchi H, Hirano H, Kubomura S, Higashi K, Mizuguchi Y. Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermostable direct hemolysin and the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. Microbial Pathogenesis. 1986;1:425-32.
11. Shinoda S, Matsuoka H, Tsuchie T, Miyoshi S, Yamamoto S, Taniguchi H, Mizuguchi Y. Purification and characterization of a lecithin-dependent haemolysin from *Escherichia coli* transformed by a *Vibrio parahaemolyticus* gene. Journal of general microbiology. 1991;137:2705-11. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-12-2705>
12. Arunagiri K, Jayashree K, Sivakumar T. Isolation and identification of Vibrios from marine food resources. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2013;2(7):217-32.
13. McCarthy SA, DePaola A, Cook DW, Kaysner CA, Hill WE. Evaluation of alkaline phosphatase- and digoxigenin-labelled probes for detection of the thermolabile hemolysin (tlh) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. Letters in Applied Microbiology. 1999;28:66-70. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00467.x>
14. Panicker G, Call DR, Krug MJ, Bej AK. Detection of Pathogenic *Vibrio* spp. in Shellfish by Using Multiplex PCR and DNA Microarrays. Applied and Environmental Microbiology. 2004;70(12):7336-444. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7436-7444.2004>
15. Lua ĐT, Khuê NV, Vân PT. Non-*Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) trên tôm nuôi. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 2016;14(5):690-8.
16. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution. 1993;10:512-26.
17. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution. 2016;33:1870-4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
18. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3--new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Research. 2012;40(15):115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>