



NGHIÊN CỨU TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GENE *eltA* CỦA *E. COLI* GÂY TIÊU CHẢY Ở LỢN

Đinh Thị Bích Lân^{1*}, Đặng Thanh Long¹, Lê Công Thịnh¹, Phùng Thăng Long²,
Hoàng Thị Thùy Nhung¹, Lê Quốc Việt¹

¹ Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

² Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

Tóm tắt: Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tạo dòng và biểu hiện thành công gene *eltA* mã hóa cho tiểu đơn vị A độc tố LT của vi khuẩn *E. coli* trong tế bào khả biến *E. coli* BL21 (DE3). Đoạn gene *eltA* phân lập từ ADN tổng số của *E. coli* thu được từ mẫu phân lợn tiêu chảy có kích thước 798 bp, tương đồng 99 % với trình tự gene được công bố trên ngân hàng Gene (mã số: K01995.1), trong đó phần gene mã hóa cho tiểu đơn vị A của độc tố LT (LT-A) có kích thước 777 bp, mã hóa chuỗi polypeptide dài 258 amino acid, tương đồng 98 % với chuỗi polypeptide được công bố trên GenBank (mã số: AAA24685.1). Phân tích điện di SDS cho thấy protein dung hợp 6xHis-LT-A có khối lượng phân tử khoảng 30 kDa.

Từ khóa: *eltA*, LT, độc tố không chịu nhiệt, *E. coli*

1 Đặt vấn đề

Vi khuẩn ETEC (Enterotoxigenic *Escherichia coli*) gây tiêu chảy ở người và động vật do có khả năng tiết ra các loại độc tố gây rối loạn chức năng chuyển hóa nước và muối ở ruột dẫn đến hiện tượng không hấp thu được nước [3]. Các loại độc tố này bao gồm: độc tố chịu nhiệt (heat stable enterotoxins - STs) và độc tố không chịu nhiệt (heat labile enterotoxins - LTs). Độc tố không chịu nhiệt (heat labile toxin) có tính kháng nguyên mạnh, quyết định tới khả năng gây tiêu chảy của nhóm vi khuẩn *E. coli* gây bệnh đường ruột (ETEC) [1, 6]. Độc tố không chịu nhiệt LT bao gồm một tiểu đơn vị A có khối lượng 25 kDa và 5 tiểu đơn vị B, mỗi đơn vị có khối lượng 11,5 kDa. Sau khi phân B giúp độc tố bám vào tế bào biểu mô ruột thì phần A được đẩy vào bên trong tế bào, làm hoạt hóa enzyme adenylate cyclase. Khi enzyme adenylate cyclase hoạt hóa thì cAMP vòng nội bào tăng lên dẫn đến ức chế hấp thu Na⁺ ở tế bào niêm mạc ruột, tăng bài tiết Cl⁻ vào lòng ruột, làm cho áp lực thẩm thấu trong lòng ruột tăng nhanh. Hậu quả là một lượng lớn nước từ trong tế bào được kéo ra ngoài lòng ruột để cân bằng áp lực thẩm thấu giữa trong và ngoài tế bào, gây tiêu chảy [1]. Tiêm vắc xin hoặc kháng thể kháng độc tố cho động vật có thể hạn chế tác hại của độc tố. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu nhằm tạo ra kháng nguyên tái tổ hợp, tạo nguồn nguyên liệu sản xuất vắc xin hoặc kháng thể sử dụng trong phòng và trị bệnh do *E. coli* gây ra.

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm tạo dòng và biểu hiện gene *eltA* mã hóa cho tiểu đơn vị A độc tố LT phân lập từ *E. coli* gây tiêu chảy ở lợn để làm nguyên liệu cho sản xuất vắc xin và kháng thể kháng *E. coli* gây tiêu chảy ở lợn.

* Liên hệ: thuhuong@huaf.edu.vn

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên vật liệu

Mẫu phân được thu nhận từ lợn tiêu chảy tại nhiều địa phương khác nhau ở Thừa Thiên Huế. Chúng vi khuẩn *E. coli* TOP10, BL21(DE3), vector pGEM[®]-T Easy (Invitrogen), vector pET200/D-TOPO (Invitrogen), Kit tách chiết ADN tổng số: QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit (50) (Qiagen), Kit tinh sạch gel: Kit Isolate II PCR and Gel (Bioline) và Kit tách chiết plasmid tái tổ hợp (EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps Kit, BS6141 (Bio Base INC)) và một số hóa chất thông dụng khác.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Thu thập mẫu phân lợn tiêu chảy: Mẫu phân (100 mẫu) của lợn bị tiêu chảy, chưa được điều trị bằng thuốc kháng sinh được thu bằng cách dùng tấm bông ngoáy sâu vào hậu môn, bỏ tấm bông vào ống falcon chứa môi trường LB và chuyển về phân tích ở phòng Miễn dịch học và vắc xin, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế.

*Phân lập gene *eltA* :* ADN tổng số của *E. coli* gây tiêu chảy ở lợn (từ 100 mẫu phân) được tách chiết bằng QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit (50) (Qiagen). Cặp mồi đặc hiệu dùng để thu nhận gene *eltA* được thiết kế dựa trên trình tự nucleotide được công bố trên ngân hàng gene thế giới với mã số GenBank là K01995.1 (Bảng 1).

Thành phần phản ứng PCR bao gồm: 12,5 µl 2 × PCR master Mix (2,4 mM dNTP mỗi loại, 0,3 đơn vị Taq DNA polymerase (Thermo), 1 µl mồi xuôi PeltAF (10 pmol/µl), 1 µl mồi ngược PeltAR (10 pmol/µl), 1 µl ADN khuôn mẫu và 9,5 µl nước tinh khiết. PCR được thực hiện trong máy luân nhiệt (MJ mini[™] Personal Thermal cycler, BioRad) với chu trình luân nhiệt như sau: biến tính genome 95 °C /5 phút; tiếp đến là 35 chu kỳ: 94 °C /1 phút, 55 °C /1 phút và 72 °C /1 phút; cuối cùng là 72 °C /10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di agarose gel 1 % với thuốc nhuộm ethidium bromide (0,5 µg/l) và phân tích hình ảnh điện di bằng hệ thống Gel Documentation (BioRad).

Bảng 1. Thành phần nucleotide các mồi dùng trong phản ứng PCR thu nhận gene *eltA*

Tên mồi	Trình tự nucleotide chuỗi mồi (5'→3')	Độ dài sản phẩm PCR
PeltAF	ATGATATATAAGTTTCCTCGATG	798 bp
PeltAR	CATAATTCATCCCGAATTCTG	

Tạo dòng gene: Sản phẩm PCR (3 mẫu trong số 100 mẫu phân đã được kiểm tra bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu) sau khi tinh sạch bằng Kit Isolate II PCR and Gel (Bioline) được tạo dòng trong vector pGEM[®]-T Easy (Invitrogen) theo phương pháp dòng hóa TA (TA-cloning), thành phần phản ứng gắn bao gồm: 50 ng vector pGEM[®]-T Easy, 5 µl đệm, 3 đơn vị T4 DNA ligase, 40 ng sản phẩm PCR, sau đó bổ sung nước cất vô trùng để đạt thể tích cuối cùng 10 µl, phản ứng được ủ ở 25 °C trong 1 giờ, sau đó ủ qua đêm ở 4 °C. Sản phẩm gắn sau đó được biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10 bằng phương pháp hóa biến nạp, thể biến nạp được chọn lọc bằng phương

pháp khuẩn lạc xanh - trắng trên môi trường chọn lọc với thành phần: 0,5 % dịch chiết nấm men + 1 % Tryptone + 1 % NaCl + 1,5 % agar + 100 µg/ml Ampicillin + 100 mM IPTG + 20 mg/ml X-Gal và kiểm tra bằng kỹ thuật PCR với các cặp mồi đặc hiệu cho gene *eltA* và với cặp mồi M13 (M13F: 5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3' và M13R: 5'CAGGAAACAGCTATGAC-3') được thiết kế sẵn trên vector pGEM®-T Easy.

Sau khi tách chiết ADN plasmid tái tổ hợp bằng EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps kit, BS6141 (Bio Base INC), gửi đi phân tích trình tự nucleotide của gene *eltA* ở Công ty 1st BASE, Malaysia thông qua Công ty TNHH phát triển Công nghệ ứng dụng Việt Nam VNDAT bằng phương pháp dideoxy terminator trên máy ABI 3130 Analysis. Kết quả giải trình tự gene được phân tích bằng phần mềm BioEdit và so sánh mức độ tương đồng với trình tự đã được công bố trên ngân hàng gene NCBI.

Biểu hiện gene trong vector pET200/D-TOPO: Vùng gene tổng hợp tiểu đơn vị A của độc tố LT của *E. coli* (LT-A) được chọn làm vùng đích để thiết kế cặp mồi thu nhận gene *eltA* (có mã số GenBank là K01995.1). Trình tự CACC được bổ sung vào phía đầu 5' của gene giúp tạo dòng định hướng cho sản phẩm PCR vào vector pET200/D-TOPO (Invitrogen) được thiết kế phần lồi ra (overhang) GTGG (Bảng 2).

Bảng 2. Thành phần primer dùng trong phản ứng PCR thu nhận đoạn gene mã hóa tiểu đơn vị A protein độc tố LT

Tên mồi	Trình tự nucleotide chuỗi mồi (5'→3')	Độ dài sản phẩm PCR (bao gồm 4 nucleotide CACC)
TopoeltAF	CACCATGAAAAATATAACTTTCA	781 bp
PeltAR	CATAATTCATCCCGAATTCTG	

Vector tái tổ hợp pGEM®-T/*eltA* được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR thu nhận gene *eltA* để thực hiện phản ứng gắn vào vector pET200/D-TOPO. Thành phần phản ứng PCR bao gồm: Vector tái tổ hợp pGEM®-T/*eltA* (50 ng), 1 µl mồi xuôi TopoeltAF (10 pmol/µl), 1 µl mồi ngược PeltAR (10 pmol/µl), 5 µl 10 x đệm PCR, 1 µl dNTP (10 pmol/µl), Enzyme pfu (5U/µl), nước cất vô trùng cho đủ 50 µl. Phản ứng PCR được thực hiện với chu kỳ luân nhiệt như sau: biến tính DNA 95 °C /5 phút; tiếp đến là 35 chu kỳ: 94 °C /1 phút, 55 °C /1 phút và 72 °C /1 phút; cuối cùng là 72 °C /10 phút. PCR thực hiện trên máy MJ-Mini™ Personal Thermal Cycle, Bio-Rad và điện di kiểm tra trên gel agarose 1 %.

Sản phẩm PCR được cắt ra trên gel agarose 1 % và tinh sạch bằng Kit Isolate II PCR and Gel (Bioline), sau đó gắn vào vector pET200/D-TOPO mang promoter T7 (Invitrogen, Mỹ). Thành phần phản ứng gắn bao gồm: 8 ng DNA, 20 ng vector pET200/D-TOPO, 1 µl đệm gắn, bổ sung nước cất vô trùng để đạt thể tích phản ứng là 6 µl. Trộn nhẹ và ủ ở 25 °C trong 60 phút, sau đó gắn ở 4 °C qua đêm. Sản phẩm gắn sau đó được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng BL21(DE3) của hãng Invitrogen bằng phản ứng hóa biến nạp với thành phần bao gồm: 3 µl phản ứng gắn, 50 µl tế bào *E. coli* và 250 µl môi trường SOC (2 % tryptone; 0,5 % dịch chiết nấm men; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄ và 20 mM glucose; pH 7) [4].

Sản phẩm biến nạp được cấy trải trên đĩa petri chứa môi trường LB đặc (1 % tryptone; 0,5 % dịch chiết nấm men và 1 % NaCl; 1,5 % agar, pH 7) có bổ sung 100 µg/ml kanamycin và ủ ở 37 °C qua đêm [4]. Vector pET200/D-TOPO không có khả năng tự đóng vòng, do đó những

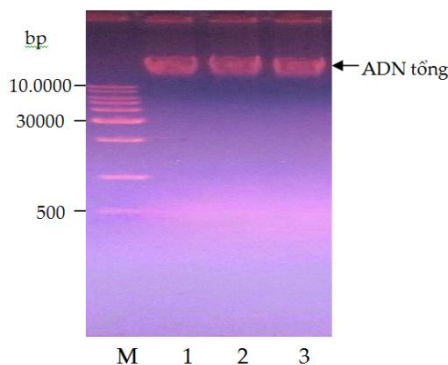
tế bào *E. coli* sống được trên môi trường chọn lọc (LB + kanamycin) đều mang vector pET200/D-TOPO tái tổ hợp với sản phẩm PCR [5]. Sự có mặt của gene *eltA* trong tế bào *E. coli* được kiểm tra bằng PCR.

Các tế bào *E. coli* BL21(DE3) có chứa vector biểu hiện mang gene *eltA* được nuôi trong bình tam giác với 250 ml môi trường LB lỏng có 100 µg/ml kanamycin ở 37 °C, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Khi mật độ tế bào của dịch nuôi cấy đạt tới OD₆₀₀ = 1,0 thì bổ sung IPTG nồng độ 1 mM và nuôi tiếp ở 37 °C. Sau khi nuôi cấy, sinh khối tế bào được thu nhận bằng cách ly tâm 6.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4 °C. Tế bào *E. coli* được phá vỡ trong 8 ml đệm NBB (250 mM NaH₂PO₄, 2,5 M NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0) + 1 % Triton X - 100 + 1 mg/ml lysozyme), ủ trong đá 60 phút, sau đó siêu âm trong 5 phút. Tiếp theo ly tâm 15.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4 °C thu dịch protein tổng số nội bào có chứa protein dung hợp 6xHis-LT-A. Protein tái tổ hợp LT-A ở dạng dung hợp được tinh sạch bằng gel ProBond™ Purification System kit (Invitrogen, USA). Mức độ biểu hiện protein được phân tích bằng điện di trên gel polyacrylamide 15 % chứa SDS. Bằng cách gel được nhuộm với Coomassie Blue R₂₅₀ và hình ảnh được phân tích bằng phần mềm Quality One (ver 4.1, Bio-Rad).

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Tách chiết ADN tổng số của vi khuẩn *E. coli* từ mẫu phân

ADN tổng số của *E. coli* được tách chiết từ 100 mẫu phân bằng QIAamp® DNA Stool Mini Kit (50) (Qiagen). Chất lượng sản phẩm ADN được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1 %. Kết quả được trình bày trên hình 1. ADN tổng số cho nồng độ cao, rõ nét, không bị đứt gãy.



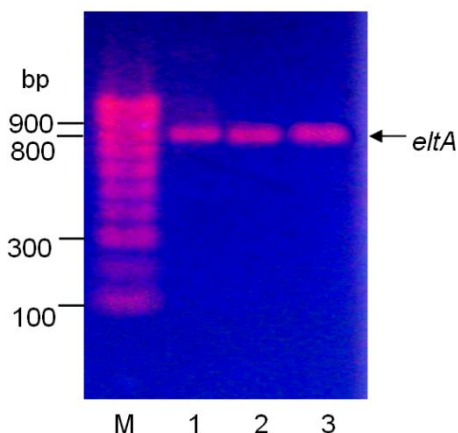
Hình 1. Kết quả tách chiết ADN tổng số của vi khuẩn *E. coli* được tách chiết từ mẫu phân. M: khối lượng phân tử ADN chuẩn (500-10.000 bp), 1, 2 và 3: ADN tổng số các mẫu khác nhau

3.2 Phân lập gene *eltA* mã hóa cho tiểu đơn vị A độc tố LT

Gene *eltA* (có mã số K01995.1 trên GenBank) mã hóa cho tiểu đơn vị A độc tố LT của *E. coli* có chiều dài 934 bp. Cặp mồi thiết kế nhằm để thu nhận gene *eltA* bắt đầu từ nucleotide thứ 137 đến 934 bp với sản phẩm PCR có chiều dài theo tính toán lý thuyết là 798 bp. Đoạn gene

này có chứa vùng mã hóa tạo tiểu phần A của độc tố LT (vùng CDS) có chiều dài 777 bp (từ vị trí nucleotide 158 đến 934) với đoạn peptide tín hiệu nằm từ vị trí 158 đến 211 bp, mã hóa tạo thành chuỗi peptide dài 258 amino acid và có khối lượng phân tử ước tính 28,38 kDa. Sau khi tách chiết ADN tổng số và thực hiện phản ứng PCR phân lập gene *eltA* với cặp mồi đặc hiệu, sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1 %, kết quả điện di thể hiện ở hình 2.

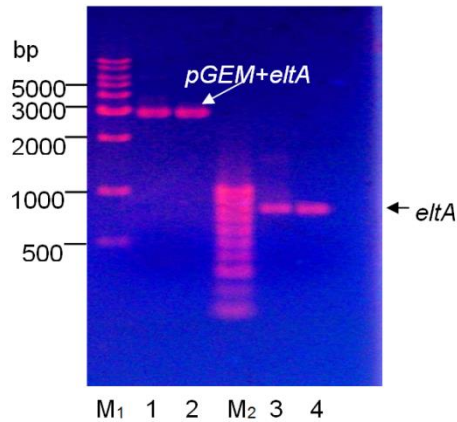
Kết quả điện di cho thấy sản phẩm PCR gene *eltA* của *E. coli* có kích thước khoảng 810 bp cao hơn so với kích thước tính toán lý thuyết của gene *eltA* với cặp mồi đặc hiệu PeltAF và PeltAR, sở dĩ có hiện tượng này là do đặc tính của enzyme Taq DNA polymerase xúc tác cho phản ứng PCR có khả năng gắn thêm Adenine vào đầu 3' của gene (trình tự này có thể lên đến 200 bp). Mặt khác, sản phẩm PCR cho một băng đơn nhất, có chất lượng tốt, ổn định qua nhiều lần lặp lại thí nghiệm. Do vậy, bước đầu chúng tôi nhận định rằng toàn bộ quy trình phản ứng PCR là chính xác từ thiết kế mồi, chu trình nhiệt và các bước thực hiện.



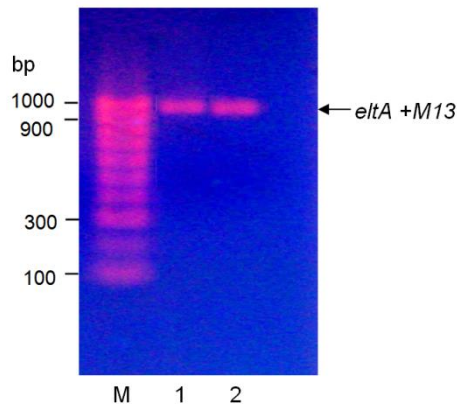
Hình 2. Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gene *eltA* trên gel agarose 1 %. Giếng M: Khối lượng thang chuẩn ADN 100 -1000 bp; giếng 1, 2 và 3: sản phẩm PCR của gene *eltA* được phân lập từ ADN tổng số tách chiết từ vi khuẩn *E. coli*

3.3 Tạo dòng và phân tích trình tự gene *eltA* của *E. coli*

Sản phẩm PCR (gene *eltA*) sau khi tinh sạch được gắn vào vector pGEM®-T Easy theo phương pháp TA dưới xúc tác của enzyme ligase T4 ở 4 °C và biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10. Sự hiện diện của gene *eltA* trong tế bào *E. coli* TOP10 được kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu (PeltAF và PeltAR) và cặp mồi M13 được thiết kế ở hai đầu vùng tạo dòng trên vector với khuôn mẫu là ADN plasmid tách từ các dòng khuẩn lạc trắng chọn lọc ngẫu nhiên. Kết quả tách chiết ADN plasmid chỉ cho một băng duy nhất và sản phẩm PCR cho thấy đã xuất hiện băng đúng với kích thước sản phẩm PCR phân lập ban đầu (810 bp) đối với cặp mồi đặc hiệu (hình 3) và lớn hơn khoảng 200 bp đối với cặp mồi M13 (1010 bp) (hình 4).



Hình 3. Ảnh điện di sản phẩm plasmid từ các dòng dương tính và kết quả PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gene *eltA* từ khuôn mẫu ADN plasmid tái tổ hợp thu được trên gel agarose 1 %. Giếng M₁: khối lượng thang chuẩn ADN (500 – 10000 bp); giếng M₂: khối lượng thang chuẩn ADN (100 – 1000 bp); giếng 1 và 2: plasmid được tách chiết từ hai dòng dương tính



Hình 4. Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR với cặp mồi M13 trên gel agarose 1 %. Giếng M: khối lượng thang chuẩn ADN (100 – 1000 bp); giếng 1 và 2: sản phẩm PCR (bao gồm kích thước của gene *eltA* + kích thước do cặp mồi M13 khuếch đại trên vector pGEM khoảng 200 bp) từ 2 plasmid được tách ra từ hai dòng dương tính khác nhau

Kết quả phân tích trình tự nucleotide cho thấy đoạn gene *eltA* phân lập được từ ADN của *E. coli* gây bệnh tiêu chảy ở lợn có kích thước 798 bp (bao gồm cả bộ ba kết thúc) và tương đồng 99 % với đoạn gene *eltA* đã được công bố trên ngân hàng gene với mã số K01995.1 (hình 5). Sự thay đổi nucleotide của gene *eltA* đã làm ảnh hưởng đến trình tự amino acid được mã hóa (hình 6), trong đó có 4 vị trí amino acid bị thay thế theo thứ tự là: Arginine (R) được thay thế bằng Lysine (K), Asparagin (N) được thay thế bằng Aspartate (D), Glutamate (E) được thay thế bằng Lysine (K) và Aspartate (D) được thay thế bằng Asparagin (N). Sự khác biệt này có thể là do các biến thể xảy ra tự nhiên trong vi khuẩn *E. coli* gây tiêu chảy ở lợn ở các vùng thu mẫu khác nhau. Tuy nhiên, kết quả trình tự amino acid cho độ tương đồng cao với trình tự công bố trên ngân hàng gene thế giới là 98 %.

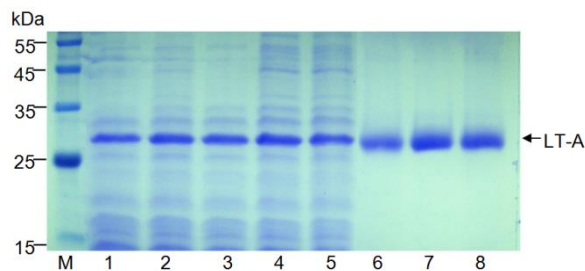
AAA24685.1	22	MKNITFIFFILLASPLYANGD R LYRADSRRPDEIKRSGGLMPRGHNEYFDRGTQMNINLY	201
eltA	1	MKNITFIFFILLASPLYANGD K LYRADSRRPDEIKRSGGLMPRGHNEYFDRGTQMNINLY	60
AAA24685.1	202	DHARGTQTGFVRYDDGYVSTLSLSLRSAGLAGQSILSGYSTYYIYVIATAPNMFVNDVLG	381
eltA	61	DHARGTQTGFVRYDDGYVSTLSLSLRSAGLAGQSILSGYSTYYIYVIATAPNMFVNDVLG	120
AAA24685.1	382	VYSPHPYEQEVSALGGIPYSQIYGWYRVNFGVIDERLHRNREYRDRYYRNLNIAPAEDGY	561
eltA	121	VYSPHPYEQEVSALGGIPYSQIYGWYRVNFGVIDERLHRNREYRDRYYRNLNIAPAEDGY	180
AAA24685.1	562	RLAGFPPDHQAWREEPWIHHAPQGC G NSRRTITGDTTCNEETQNLSTIYLR E YQSKVKRQI	741
eltA	181	RLAGFPPDHQAWREEPWIHHAPQGC D SSRRTITGDTTCNEETQNLSTIYLR K YQSKVKRQI	240
AAA24685.1	742	FSDYQSEVDIYNRIR D EL	795
eltA	241	FSDYQSEVDIYNRIR N EL	258

Hình 6. Mức độ tương đồng của trình tự amino acid của protein LT-A do chúng tôi phân lập và protein LT-A đã được công bố trên Genbank (mã số: AAA24685.1)

3.4 Biểu hiện gene *eltA* trong tế bào khả biến *E. coli* BL21 (DE3)

Trình tự gene *eltA* được thu nhận bằng phản ứng PCR với cặp môi TopoeltAF và PeltAR từ khuôn mẫu vector pGEM®-T/*eltA* được tạo dòng trong vector pET200/D-TOPO sau đó biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3) bằng phương pháp hóa biến nạp. Các khuẩn lạc mang vector biểu hiện pET200/D-TOPO chứa gene *eltA* được kiểm tra bằng phản ứng PCR. Tế bào *E. coli* BL21 (DE3) dương tính được chọn lọc và chuyển sang nuôi cấy trong 50 ml môi trường LB lỏng bổ sung 100 µg/ml kanamycin, cảm ứng sinh protein với 1 mM IPTG (BioRad) ở 37 °C (OD₆₀₀ = 0,8), lắc 200 vòng/phút. Sự biểu hiện của protein LT-A được kiểm tra trên gel polyacrylamide 15 % có bổ sung SDS.

Kết quả điện di SDS cho thấy có một băng protein đậm xuất hiện ở vị trí khoảng 30 kDa ở mẫu được cảm ứng và ổn định qua nhiều lần lặp lại thí nghiệm. Kết quả tinh sạch protein dung hợp bằng ProBond™ Purification System Kít (Invitrogen, USA) cũng cho một băng protein duy nhất, đậm với kích thước tương tự (hình 7). Vì vậy, có thể khẳng định gene *eltA* phân lập từ *E. coli* gây tiêu chảy ở lợn đã được biểu hiện thành công và đặc hiệu.



Hình 7. Ảnh điện di thăm dò khả năng biểu hiện của protein tái tổ hợp LT-A và khả năng liên kết giữa đuôi 6xHis với phối tử Ni²⁺ trên gel SDS – PAGE 15 %. M: khối lượng thang chuẩn protein (10-170 kDa). 1-5: *E. coli* BL21 tái tổ hợp cảm ứng với 1 mM IPTG qua các lần khác nhau, 6-8: protein tái tổ hợp LT-A sau khi ly giải ra khỏi cột sắc ký

4 Kết luận

Chúng tôi đã tạo dòng và biểu hiện thành công gene mã hóa tiểu phần A của độc tố chịu nhiệt (LT) của *E. coli* gây tiêu chảy ở lợn trong tế bào *E. coli* BL21(DE3). Đoạn gene *eltA* phân lập từ ADN tổng số của *E. coli* có kích thước 798 bp, tương đồng 99 % so với trình tự đã được công bố trên GenBank (mã số GenBank K01995.1). Đoạn gene mã hóa cho tiểu phần A độc tố LT có kích thước 776 bp, tạo chuỗi polypeptide có chiều dài 258 amino acid và có độ tương đồng 98 % với trình tự công bố trên GenBank (mã số AAA24685.1). Phân tích điện di SDS cho thấy protein dung hợp 6xHis-LT-A có khối lượng phân tử khoảng 30 kDa.

Lời cảm ơn

Trân trọng cảm ơn Đại học Huế đã tài trợ kinh phí cho nghiên cứu (mã số DHH 2016-15-05)

Tài liệu tham khảo

1. Cai Y., Yordan M.A., Yao Q., Li Y., Yu L. (2016), Review of enterotoxigenic *Escherichia coli* enterotoxins. *Academia Journal of Microbiology Research*, 4(1), 005-008.
2. Giannella R. A., Drake K. W., Luttrell M. (1981), Development of a radioimmunoassay for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Infect Immunology* (33), 186-192.
3. Gill D. M., Richardson S. H. (1980), Adenosine diphosphate-ribosylation of adenylate cyclase catalyzed by heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*: comparison with cholera toxin. *The Journal of Infectious Diseases*, 141, 64-70.
4. Loc N. H., Ngọc L. M. T., Lan T. T., Viet L. Q., Thao L. D., Quang H. T., Lan D. T. B., Long P. T. (2013). Cloning and expression of genes encoding F107-C and K88-1NT fimbrial proteins of enterotoxigenic *Escherichia coli* from piglets. *Indian Journal of Microbiology*, 53(4), 488-491.
5. Mierendorf R. C., Morris B. B., Hammer B., Novy R. E. (2000), *Expression and purification of recombinant proteins using the pET system*. Humana Press Inc., Totowa, N. J.
6. Qadri F., Svennerholm A. M., Faruque A. S. G., Sack R. B. (2005), Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention, *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 465-483.

CLONING AND EXPRESSION OF *eltA* GENE OF *E. COLI* CAUSING DIARRHEA IN PIGS

Đinh Thi Bích Lân^{1*}, Dang Thanh Long¹, Le Cong Thinh¹, Phung Thang Long²,
Hoang Thi Thuy Nhung¹, Le Quoc Viet¹

¹ Institute of Biotechnology, Hue University

² College of Agriculture and Forestry, Hue University

Abstract: In this study, we cloned and expressed a gene coding for the sub-unit A of a heat-labile toxin (LT) of *E. coli* in competent cells of *E. coli* BL21 (DE3). The *eltA* gene isolated from the total DNA of *E. coli* from pig feces with diarrhea has a length of 798 bp, which has 99 % of similarity to the *eltA* gene in the GenBank (accession number: K01995.1), in which the gene coding for sub-unit A of LT is 777 bp in length, encoding a polypeptide chain with 258 amino acid residues, which has 98 % of similarity to the polypeptide chain in the GenBank (accession number: AAA24685.1). The SDS electrophoresis showed that fusion protein 6xHis-LT-A has a molecular weight of around 30 kDa.

Keywords: *eltA*, LT, heat-labile toxin, *E. coli*