

## TẠO DÒNG, BIỂU HIỆN NHÂN TỐ BÁM DÍNH F18 TRÊN BỀ MẶT TẾ BÀO NẤM MEN *Pichia pastoris*

Mai Quốc Gia, Lê Văn Ngọc Trân và Trần Văn Hiếu\*

Khoa Sinh học-Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Văn Hiếu (email: [tvhieu@hcmus.edu.vn](mailto:tvhieu@hcmus.edu.vn))

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 10/08/2020

Ngày nhận bài sửa: 08/10/2020

Ngày duyệt đăng: 28/12/2020

### Title:

Cloning and surface expression of F18 fimbria on *Pichia pastoris*'s cell wall

### Từ khóa:

Dot Blot, Enterotoxigenic *Escherichia coli*, F18, *Pichia pastoris*, vaccine đường uống

### Keywords:

Dot Blot, Enterotoxigenic *Escherichia coli*, F18, oral vaccine, *Pichia pastoris*

### ABSTRACT

Post-weaning diarrhea (PWD) is one of the most common diseases endamaging the swine industry worldwide. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is the main pathogen associated with PWD in piglets. The most important virulences are adhesion factors and enterotoxins. F4 and F18 are the two fimbriae frequently detected in ETEC. Vaccine is a powerful, cost-effect approach to defend against PWD. Especially, oral vaccine can stimulate mucosal immunity. Nowadays, ETEC/F4 vaccine is commercially available, but F18 fimbria is still difficult to induce mucosal immune response. In this study, a *Pichia pastoris* cell-surface display system of F18 subunit was created, and evaluated its expression on the cell wall. This surface expression system on *P. pastoris*' cell wall could be exploited for budget yet efficient oral vaccine development.

### TÓM TẮT

Tiêu chảy sau cai sữa (post-weaning diarrhea, PWD) là bệnh thường gặp ở heo con, gây tổn thất kinh tế nặng nề. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) là một trong những nguyên nhân chủ yếu gây PWD. Chúng vi khuẩn này đặc trưng bởi hai yếu tố gây bệnh là nhân tố bám dính thành ruột, và các độc tố gây mất nước. Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng tiên mao F18 và F4 là hai kháng nguyên bám dính phổ biến nhất ở các chủng ETEC trong nước và trên thế giới. Vaccine là biện pháp ngăn ngừa PWD hữu hiệu và kinh tế, đặc biệt là vaccine uống với khả năng kích thích hệ miễn dịch đường ruột. Hiện nay vaccine uống phòng ETEC/F4 đã được thương mại hóa, tuy nhiên nhân tố bám dính F18 vẫn gặp nhiều khó khăn trong việc kích thích miễn dịch niêm mạc ruột. Ở nghiên cứu này, hệ thống nấm men *Pichia pastoris* biểu hiện nhân tố bám dính F18 trên bề mặt được phát triển và đánh giá khả năng biểu hiện trên màng. Kết quả cho thấy F18 đã được biểu hiện trong phân đoạn màng của *P. pastoris*. Hệ thống biểu hiện trên bề mặt nấm men *P. pastoris* này có thể được ứng dụng nhằm tạo ra vaccine uống giá rẻ và hiệu quả.

Trích dẫn: Mai Quốc Gia, Lê Văn Ngọc Trân và Trần Văn Hiếu, 2020. Tạo dòng, biểu hiện nhân tố bám dính F18 trên bề mặt tế bào nấm men *Pichia pastoris*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(6B): 139-145.

## 1 MỞ ĐẦU

Tiêu chảy ở heo con sau cai sữa (post-weaning diarrhea, PWD) là bệnh thường gặp ở heo trong khoảng thời gian hai tuần đầu sau cai sữa, gây tiêu chảy rất nặng, làm giảm trọng lượng cơ thể 10-12% trong vòng 6 giờ (Holland, 1990; Fairbrother *et al.*, 2005). Kết quả là heo con bị ức chế hệ thần kinh trung ương, trở nên yếu hơn, và có thể chết do sốc thể tích với tỷ lệ chết lên đến 30% (Rhouma *et al.*, 2017). Do đó, bệnh ảnh hưởng lớn tới năng suất, gây thiệt hại lớn tới nền kinh tế, gây lỗ 20.000 USD/đàn lợn mỗi năm (Luppi *et al.*, 2016). Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) là nguyên nhân chính gây ra tiêu chảy sau cai sữa ở heo (Thuy *et al.*, 2006). ETEC đặc trưng bởi nhân tố bám dính và các độc tố gây bệnh. Nhân tố bám dính là thành phần quan trọng giúp ETEC bám vào lớp biểu mô ruột. Sau khi bám vào biểu mô ruột, ETEC tiết độc tố gây ra tiêu chảy như LT, STa, và STb (Fairbrother *et al.*, 2005). Hai nhân tố bám dính thường được tìm thấy ở ETEC gây PWD là F4 (45,1%), và F18 (33,9%). F4 là fimbria dạng sợi dài, gồm tiểu đơn vị chính FaeG, và các tiểu đơn vị nhỏ: FaeF, FaeH, FaeC, và FaeI (Grange *et al.*, 2002). F18 là các sợi dài 1 đến 2 nm, với cấu trúc chính là FedA, và các tiểu đơn vị nhỏ: FedB, FedC, FedE, FedF (Smeds *et al.*, 2001).

Phương án điều trị phổ biến khi heo nhiễm ETEC là sử dụng kháng sinh. Tuy nhiên, kháng sinh vẫn có nhiều hạn chế như: tồn kém, tồn thời gian, tỷ lệ tử vong cao. Hơn nữa, kháng sinh đã vô tình tạo ra nhiều chủng kháng kháng sinh, đặc biệt là colistin, giải pháp cuối cùng cho các bệnh do nhiễm trùng Gram âm đa kháng (Kempf *et al.*, 2013). Vì vậy, việc phát triển vaccine, biện pháp phòng ngừa hiệu quả nhất, đang thu hút sự quan tâm từ các nhà nghiên cứu. Có hai loại vaccine phổ biến là vaccine tiêm và vaccine uống. Với ưu điểm tạo được kháng thể IgA dạng tiết, vaccine uống là lựa chọn hoàn hảo cho việc phòng bệnh đường ruột. Hiện nay, đã có nhiều vaccine phòng ETEC được thương mại hóa (Nadeau *et al.*, 2016). Tuy nhiên, các vaccine đó chỉ phòng được ETEC/F4, hoàn toàn vô dụng với ETEC/F18. Các vaccine nhắm vào nhân tố bám dính F18 đã tạo ra được đáp ứng miễn dịch với ETEC/F18, tuy nhiên không thể bảo vệ heo con khỏi PWD. Nguyên nhân là do phần bám dính của F18 là tiểu phần nhỏ FedF. FedF với số lượng ít, dễ bị đứt ra khỏi F18 do có tương tác yếu với FedA, và dễ dàng bị phân hủy trong môi trường ruột khi tồn tại đơn lẻ (Tiels *et al.*, 2007). Các yếu tố trên gây nhiều khó khăn trong việc tạo IgA kháng tiểu phần FedF. Khi đó, IgA dạng tiết kháng F18, chính xác là IgA

kháng FedA sẽ không thể ngăn việc bám dính của ETEC (Tiels *et al.*, 2008).

Để bảo vệ sự nguyên vẹn, FedF cần được chứa trong các hệ thống mang. Các hệ thống này giúp tăng cường khả năng tiếp nhận, và giảm sự tác động của điều kiện đường ruột khắc nghiệt. Các hệ thống phân phối kháng nguyên phổ biến như: liposome bản chất là lớp đôi phospholipid kỵ nước; virus like particles (VLPs) có chứa các trình tự peptide đặc trưng và cấu trúc 3D tương tự virus tự nhiên (Davitt and Lavelle, 2015). Ngoài ra, các hệ thống mang sinh vật như *Lactobacillus* và nấm men đang được chú ý. Các hệ thống mang này là các sinh vật có khả năng biểu hiện kháng nguyên trên bề mặt. Ở hệ thống liposome, kháng nguyên sẽ được thu nhận, sau đó được bọc lại trong lớp phospholipid kỵ nước. Các bước thu nhận và bọc kháng nguyên đòi hỏi thời gian dài, kỹ thuật, chi phí cao, do đó tính ứng dụng không cao. Hệ thống VLPs giúp giữ hoàn toàn cấu trúc kháng nguyên, tuy nhiên các thao tác, kỹ thuật ở hệ thống này đòi hỏi trình độ kỹ thuật cao, thời gian dài. *Lactobacillus* và nấm men đang là các hệ thống giàu tiềm năng. Sau khi được tạo ra, chúng có khả năng tăng sinh và biểu hiện vô hạn, mang lại nguồn nguyên liệu lớn trong thời gian ngắn. Tuy nhiên, hệ thống *Lactobacillus* đòi hỏi các điều kiện sống, tăng sinh phức tạp, đặc độ hơn nhiều so với nấm men. Với ưu điểm về chi phí, kỹ thuật, thời gian cũng như khả năng biểu hiện protein ngoại lai, nấm men là hệ thống vận chuyển tiềm năng. Chủng nấm men được ứng dụng nhiều hiện nay là *Saccharomyces cerevisiae* và *Pichia pastoris*. *S. cerevisiae* thường được dùng cho mục tiêu biểu hiện protein bề mặt chứ không dùng thu protein tiết, điều này có thể do *S. cerevisiae* có các neo tự nhiên, cũng như hiệu suất tiết protein mục tiêu kém hơn *P. pastoris* (Pepper *et al.*, 2008; Ahmad *et al.*, 2014). Nhằm mục tiêu biểu hiện nhiều nhất kháng nguyên trên bề mặt nấm men, các neo tự nhiên của *S. cerevisiae* sẽ được dung hợp với kháng nguyên và biểu hiện trong *P. pastoris* (Wang *et al.*, 2007). Neo được lựa chọn là  $\alpha$ -Agglutinin, đây là một chuỗi polypeptide neo mạch đơn được mã hóa bởi gene  $\alpha 1$ .  $\alpha$ -agglutinin là neo màng đầu C, với đầu N mang nhiệm vụ tiết và đầu C giúp protein này neo vào màng tế bào. Khi biểu hiện protein bề mặt, protein mục tiêu được dung hợp với phần đầu C của  $\alpha$ -agglutinin và biến đổi sau dịch mã gắn đuôi Glycophosphatidylinositol (GPI), trình tự này giúp đầu C của  $\alpha$ -agglutinin neo lại trên thành và để lộ protein mục tiêu ra bên ngoài tế bào (Wojciechowicz *et al.*, 1993).

Ở nghiên cứu này, hệ thống nấm men *P. pastoris* biểu hiện kháng nguyên F18 trên bề mặt tế bào được nghiên cứu, phát triển. Nhờ hệ thống nấm men này, kháng nguyên có thể được bảo vệ, hạn chế sự tác động của các điều kiện khắc nghiệt ở hệ tiêu hóa. Đây sẽ là hệ thống vaccine uống tiềm năng trong việc chống lại ETEC/F18.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1 Chủng chủ và plasmid

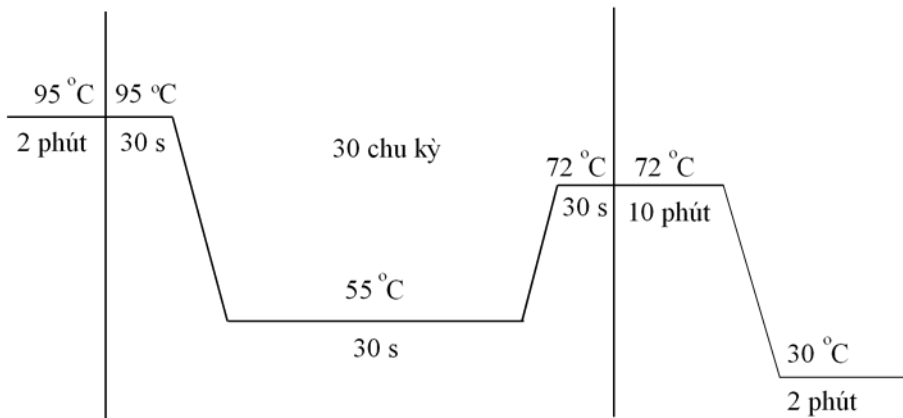
Chủng *E. coli* DH5 $\alpha$  được sử dụng làm chủng nhân bản vector tái tổ hợp. Chủng *Pichia pastoris* X33 được sử dụng làm chủng biểu hiện protein tái tổ hợp. Plasmid pET22b-*f18* được dùng làm khuôn thu nhận gene *f18*, plasmid pAOX\_HSA\_Aggl\_KanR được dùng làm khuôn thu gene *agglutinin*. Plasmid pPICZa được sử dụng để dòng hóa. Các chủng vi sinh vật và plasmid khác được cung cấp bởi Bộ môn Công nghệ Sinh học Phân tử và Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-TPHCM.

### 2.2 Cấu trúc vector tái tổ hợp pPICZaag

Gene *agglutinin* là trình tự nucleotic mã hóa phần đầu C của protein  $\alpha$ -agglutinin. Gene này được thu nhận từ plasmid pAOX\_HSA\_Aggl\_KanR bằng kỹ thuật PCR với chu trình luân nhiệt như Hình 1, với cặp mồi đặc hiệu 287FkpnI (GGTACCGCCAAAAGCTCTTTTATC) và 43RXbaI

(TCTAGACTATTAGAATAGCAGGTACG).

Plasmid pPICZa được thu nhận từ *E. coli* DH5 $\alpha$  bằng phương pháp SDS-kiểm. SDS phá màng tế bào, tạo điều kiện để NaOH gây biến tính DNA bộ gene và plasmid. Sau đó, KOAc được bổ sung vào nhằm trung hòa kiềm tính, tạo điều kiện để plasmid hồi tính nhanh thành mạch đôi và tan vào dịch nổi, DNA bộ gene và protein tạo thành một hỗn hợp tủa với potassium dodecyl sulfate, và được loại bỏ bằng ly tâm. Dịch nổi chứa plasmid sau đó tiếp tục được tinh sạch bằng cột EZ-10. Sau khi đã thu nhận thành công, gene *agglutinin* và plasmid pPICZa được xử lý tạo đầu dính với hai enzyme cắt hạn chế *KpnI* và *XbaI* (Thermo Scientific), và nối lại với nhau nhờ enzyme T4 ligase (Thermo Scientific). Sản phẩm nối được hóa biến nạp vào chủng *E. coli* DH5 $\alpha$  và được nuôi cấy trên môi trường LB (Peptone: 10 g/l, cao nấm men: 5 g/l, NaCl: 10 g/l, pH 7,0) có chứa kháng sinh zeocin (Biobasic) nồng độ cuối 50  $\mu$ g/ml. Hóa biến nạp là phương pháp biến nạp dựa trên khả năng tương tác đồng thời của ion Ca<sup>2+</sup> với DNA mang điện tích âm và với các gốc mang điện tích âm trên lớp lipopolysaccharide của vi khuẩn, tạo điều kiện để DNA dễ dàng tương tác với màng, phương pháp sốc nhiệt khiến plasmid có thể dễ dàng xâm nhập vào *E. coli*. Các thể biến nạp sau đó được tiếp tục sàng lọc bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi 287FKpnI và mồi trên plasmid pPICZa AOX3 (GCAAATGGCATTCTGACATCC), để kiểm tra gene đã được chèn vào đúng vị trí trên plasmid.



Hình 1: Chu trình luân nhiệt phản ứng PCR

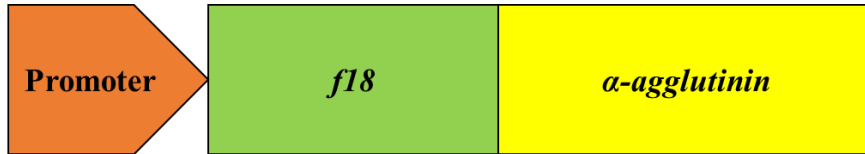
### 2.3 Cấu trúc vector tái tổ hợp pPICZaag-*f18*

Gene *f18* là trình tự nucleotic mã hóa protein F18. Gene *f18* được thu nhận bằng kỹ thuật PCR với chu trình luân nhiệt như Hình 1, khuôn là vector tái tổ hợp pET22b-*f18* với cặp mồi đặc hiệu 288FXhoI (CTCGAGAAAAGAATGGCTACTTTAGTTGTT

AA) và 289REcoRI (GAATTCCTTGTAAGTAAC CGCGTAAG). Sau đó, gene *f18* và plasmid pPICZagg cùng được xử lý với hai enzyme cắt hạn chế *XhoI* và *EcoRI* (Thermo Scientific), và nối lại với nhau nhờ enzyme T4 ligase (Thermo Scientific). Sản phẩm nối được hóa biến nạp vào chủng *E. coli*

DH5 $\alpha$  và được nuôi cấy trên môi trường LB (Peptone: 10 g/l, cao nấm men: 5 g/l, NaCl: 10 g/l, pH 7,0) có chứa kháng sinh zeocin (Biobasic) nồng độ cuối 50  $\mu$ g/ml. Các thể biến nạp sau đó được tiếp tục sàng lọc bằng kỹ thuật PCR bằng cặp môi

288FXhoI và môi trên plasmid pPICZagg AOX3. Plasmid pPICZaag-*f18* sau khi được cấu trúc thành công sẽ mang trình tự gene mã hóa protein F18, phía sau là trình tự mã hóa phần đầu C của  $\alpha$ -agglutinin như Hình 2.



Hình 2: Cấu trúc phức hợp gene biểu hiện protein F18 dính màng

#### 2.4 Tạo dòng chủng *P. pastoris* X33::*f18*

Để tăng khả năng sát nhập gene *f18* vào bộ gene chủng chủ *P. pastoris* X33 theo cơ chế tái tổ hợp, plasmid tái tổ hợp pPICZagg-*f18* được cắt với enzyme *Bgl*III. Sau đó, sản phẩm cắt được tinh chế bằng phương pháp tủa cồn và điện biến nạp vào tế bào khả nạp *P. pastoris* X33. Điện biến nạp là phương pháp sử dụng điện cao thế trong thời gian cực ngắn, làm rối loạn cấu trúc màng tế bào, tạo ra các lỗ thủng tạm thời, cho phép các phân tử DNA ngoại lai xâm nhập. Hỗn hợp biến nạp được trải trên môi trường YPD (10 g/L cao nấm men, 20 g/L peptone, glucose 2%) có bổ sung zeocin (Biobasic) nồng độ cuối 50  $\mu$ g/ml, ủ ở 30°C trong 4 ngày. Tiến hành đồng thời một mẫu đối chứng âm với tế bào khả nạp *P. pastoris* X33. Các thể biến nạp sau đó được tiếp tục sàng lọc bằng kỹ thuật PCR với cặp môi 288FXhoI và AOX3 (môi trên plasmid pPICZagg). Chủng tái tổ hợp được hoạt hóa và tăng sinh trong 10 ml môi trường BMGY có bổ sung zeocin nồng độ cuối 50  $\mu$ g/ml, lắc 250rpm ở 30°C. Khi OD<sub>600 nm</sub> = 2 – 6, sinh khối được chuyển sang 10 ml môi trường BMMY, nuôi cấy lắc 250 rpm ở 30°C (Asada *et al.*, 2011). Chất cảm ứng methanol được bổ sung với nồng độ cuối 0,5% sau mỗi 24 giờ nuôi cấy. Sau 72 giờ, sinh khối được thu nhận và hòa trong đệm PBS (11,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,96 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5,84 g NaCl, pH 7,4).

#### 2.5 Kiểm tra biểu hiện protein F18

Phần đoạn màng của chủng *P. pastoris* X33::*f18* đã cảm ứng biểu hiện được thu nhận bằng Triton-X114 (Sigma) (Taguchi and Schatzl 2014). Tiến hành đồng thời một mẫu đối chứng âm là phần đoạn màng *P. pastoris* X33. Sau đó, phần đoạn

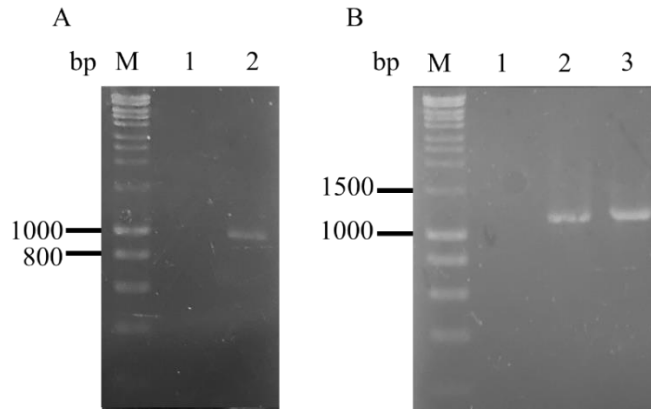
màng được chuyển lên màng nitrocellulose đã được khóa bởi sữa gầy 3% bằng máy hút chân không (Rupprecht *et al.*, 2010). Kháng thể kháng protein F18 (GS. Cox, Đại học Ghent, Bỉ), và kháng thể thứ cấp kháng kháng thể heo có đánh dấu Horseradish peroxidase (HRP) được bổ sung lên màng. Cuối cùng, cơ chất tạo màu Tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma) được bổ sung để kiểm tra sự biểu hiện của protein mục tiêu.

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Tạo dòng chủng *E. coli* DH5 $\alpha$ mang vector tái tổ hợp pPICZagg

Gene *agglutinin* được thu bằng phương pháp PCR với cặp môi đặc hiệu. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di gel agarose 1,5%. Kết quả điện di cho thấy đã thu nhận được duy nhất một đoạn gene có kích thước 960 bp, phù hợp với kích thước thiết kế (giếng 2, Hình 3A). Bên cạnh đó, đối chứng âm của phản ứng PCR với đầy đủ tất cả các thành phần như phản ứng thu gene ngoại trừ khuôn thì không có sự hiện diện của bất kì vạch DNA nào, điều này cho thấy phản ứng PCR thu nhận gene không bị ngoại nhiễm (giếng 1, Hình 3A).

Sau khi được xử lý tạo các đầu dính bằng hai enzyme cắt hạn chế là *Kpn*I và *Xba*I, gene và plasmid được nối lại với nhau thông qua T4 ligase và tiến hành biến nạp sản phẩm nối vào chủng *E. coli* DH5 $\alpha$ . Plasmid pPICZa có gene kháng kháng sinh zeocin nên các thể biến nạp được sàng lọc bước đầu trên môi trường nuôi cấy có chứa kháng sinh zeocin. Các khuẩn lạc dự tuyển này tiếp tục được sàng lọc bằng kỹ thuật PCR với cặp môi 287FKpnl và AOX3.



**Hình 3A: Thu nhận gene *agglutinin***

*M*: thang DNA 1 kb, 1: đối chứng âm, 2: sản phẩm PCR thu gene

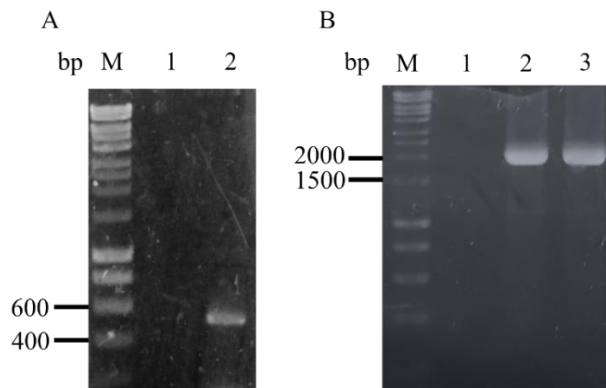
**Hình 3B: Sàng lọc thể biến nạp *E. coli* DH5a/pPICZagg**

*M*: thang DNA 1 kb, 1: đối chứng âm, 2-3: các khuẩn lạc sàng lọc

Gene *agglutinin* được chèn vào giữa vùng AOX promoter và AOX terminator của plasmid pPICZa. Do đó, sản phẩm khuếch đại của khuẩn lạc có mang vector pPICZagg có kích thước 1320 bp. Kết quả điện di cho thấy, các khuẩn lạc dự tuyển dương tính có sự xuất hiện vạch DNA kích thước nằm giữa vạch 1000 bp và 1500 bp của thang, phù hợp với kích thước dự đoán ban đầu (giếng 2, 3, Hình 3B). Hơn nữa, đối chứng âm với đầy đủ tất cả các thành phần của phản ứng PCR ngoại trừ khuôn không xuất hiện vạch, đối chứng tổ không có sự tạp nhiễm (giếng 1, Hình 3B). Các khuẩn lạc dương tính này sẽ tiếp tục được nuôi cấy và tách chiết plasmid.

**3.2 Tạo dòng chủng *E. coli* DH5a mang vector tái tổ hợp pPICZagg-*f18***

Gene *f18* được thu từ plasmid pET22b-*f18* thông qua PCR với cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR được kiểm tra thông qua điện di trên gel agarose 1,5%. Kết quả điện di cho thấy đã thu nhận được duy nhất một đoạn gene có kích thước 492 bp, phù hợp với kích thước gene *f18* (giếng 2, Hình 4A). Đối chứng âm với đầy đủ tất cả các thành phần của phản ứng PCR ngoại trừ khuôn thì không có sự hiện diện của bất kì vạch DNA nào, cho thấy phản ứng PCR thu nhận gene không bị ngoại nhiễm (giếng 1, Hình 4A).



**Hình 4A: Thu nhận gene *f18***

*M*: thang DNA 1 kb, 1: đối chứng âm, 2: sản phẩm PCR thu gene

**Hình 4B: Sàng lọc thể biến nạp *E. coli* DH5a/pPICZagg-*f18***

*M*: thang DNA 1 kb, 1: đối chứng âm, 2-3: các khuẩn lạc sàng lọc

Sau khi được xử lý tạo các đầu dính bằng hai enzyme cắt hạn chế là *XhoI* và *EcoRI*, gene *f18* và

plasmid pPICZagg được nối lại với nhau bằng T4 ligase và tiến hành biến nạp sản phẩm nối vào chủng

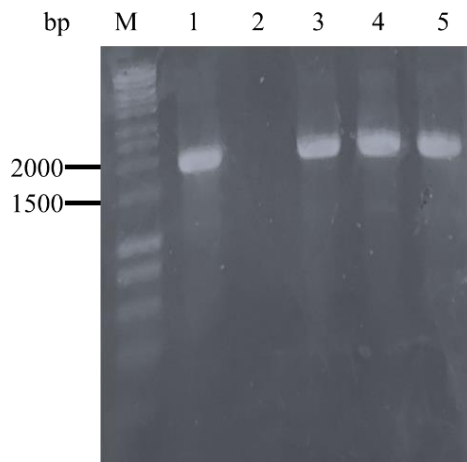
*E. coli* DH5 $\alpha$ . Plasmid pPICZagg có mang gene kháng kháng sinh zeocin nên các thể biến nạp được sàng lọc bước đầu trên môi trường nuôi cấy có chứa kháng sinh zeocin. Các khuẩn lạc dự tuyển này tiếp tục được sàng lọc bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi 288FXhoI và AOX3.

Gene *f18* được chèn vào giữa vùng AOX promoter và AOX terminator của plasmid pPICZagg. Do đó, sản phẩm khuếch đại của khuẩn lạc có mang vector pPICZagg-*f18* có kích thước 1776 bp. Kết quả điện di cho thấy, các khuẩn lạc dự tuyển dương tính có sự xuất hiện vạch DNA kích thước nằm giữa vạch 1500 bp và 2000 bp của thang, phù hợp với kích thước thiết kế (giếng 2, 3, Hình

4B). Hơn nữa đối chứng âm không xuất hiện vạch, chứng tỏ không có sự tạp nhiễm (giếng 1, Hình 4B). Các khuẩn lạc dương tính này sẽ tiếp tục được nuôi cấy và tách chiết plasmid bằng phương pháp SDS-kiểm.

### 3.3 Tạo dòng chủng *P. pastoris* X33::*f18*

Vector pPICZagg-*f18* được tiến hành biến nạp vào chủng *P. pastoris* X33. Vector pPICZagg-*f18* có mang gene kháng kháng sinh zeocin nên các thể biến nạp được sàng lọc bước đầu trên môi trường nuôi cấy có chứa kháng sinh zeocin. Các khuẩn lạc dự tuyển này tiếp tục được sàng lọc bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi 288FXhoI và AOX3.



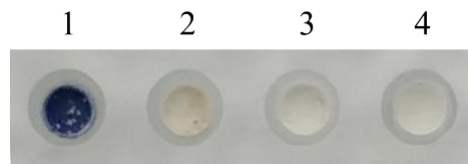
**Hình 5: Sàng lọc thể biến nạp *P. pastoris* X33::*f18***

M, thang DNA 1 kb; 1, đối chứng dương; 2, đối chứng âm; 3-5, các khuẩn lạc sàng lọc

Kết quả điện di cho thấy, các khuẩn lạc dự tuyển có sự xuất hiện vạch DNA với kích thước ngang bằng với giếng đối chứng dương (giếng 3,4,5, Hình 5). Hơn nữa, đối chứng âm với đầy đủ tất cả các thành phần của phản ứng PCR ngoại trừ khuôn không xuất hiện vạch, cho thấy không có sự tạp nhiễm (giếng 2, Hình 5). Điều này cho thấy plasmid tái tổ hợp pPICZagg-*f18* đã được biến nạp thành công vào chủng nấm men *P. pastoris* X33. Các khuẩn lạc dương tính được nuôi cấy và thu nhận nhằm kiểm tra biểu hiện.

### 3.4 Kiểm tra biểu hiện F18

Phân đoạn màng của chủng *P. pastoris* X33::*f18* được chuyển lên màng nitrocellulose và kiểm tra bằng phương pháp Dot Blot. Chỉ có chủng nấm men mang vector pPICZagg-*f18* mới có thể biểu hiện protein F18 trên bề mặt và có tín hiệu khi bổ sung cơ chất TMB.



**Hình 6 : Kiểm tra biểu hiện protein**

1: *P. pastoris* X33::*f18* + kháng thể kháng F18, 2: *P. pastoris* X33 + kháng thể kháng F18, 3: *P. pastoris* X33::*f18* không kháng thể kháng F18, 4: *P. pastoris* X33 không kháng thể kháng F18

Kết quả cho thấy chỉ có chủng nấm men *P. pastoris* X33::*f18*, với đầy đủ các thành phần mới cho kết quả hiện màu TMB (giếng 1, hình 6). Các đối chứng âm không có tín hiệu màu TMB cho thấy không có hiện tượng dương tính giả (giếng 2-4, hình 5). Điều này cho thấy đã biểu hiện thành công peptide F18 trên màng tế bào *P. pastoris* X33::*f18*.

#### 4 KẾT LUẬN

Các vector tái tổ hợp pPICZagg, và pPICZagg-*fl8* đã được cấu trúc thành công trong chủng *E. coli* (DH5 $\alpha$ ). Chủng nấm men *P. pastoris* X33::*fl8* đã được tạo thành công. Protein ngoại lai F18 đã được biểu hiện thành công trên màng tế bào nấm men *P. pastoris* X33::*fl8*.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H. and Schwab, H., 2014. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98(12): 5301-5317.
- Asada, H., Uemura, T., Yurugi, K. T., *et al.*, 2011. Evaluation of the *Pichia pastoris* expression system for the production of GPCRs for structural analysis. *Microb Cell Fact.* 10: 24.
- Davitt, C. J. and Lavelle, E. C., 2015. Delivery strategies to enhance oral vaccination against enteric infections. *Adv Drug Deliv Rev.* 91: 52-69.
- Thuy, N. D., Phu, H. C., Huyen, X. N., *et al.*, 2006. Pathotypes and serogroups of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pre-weaning pigs in north Vietnam. *J Med Microbiol.* 55(Pt 1): 93-99.
- Fairbrother, J. M., Nadeau, E. and Gyles, C. L., 2005. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev.* 6(1): 17-39.
- Grange, P. A., Mouricout, M. A., Lavery, S. B., Francis, D. H. and Erickson, A. K., 2002. Evaluation of receptor binding specificity of *Escherichia coli* K88 (F4) fimbrial adhesin variants using porcine serum transferrin and glycosphingolipids as model receptors. *Infect Immun.* 70(5): 2336-2343.
- Holland, R. E., 1990. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clinical Microbiology Reviews.* 3(4): 345-375.
- Kempf, I., Fleury, M. A., Drider, D., *et al.*, 2013. What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe? *Int J Antimicrob Agents.* 42(5): 379-383.
- Luppi, A., Gibellini, M., Gin, T., *et al.*, 2016. Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe. *Porcine Health Manag.* 2: 20.
- Nadeau, E., Tremblay, D., Bélanger, L., *et al.*, 2016. Field efficacy of Coliprotec® F4, live oral vaccine against post-weaning diarrhoea caused by F4-enterotoxigenic *E. coli* (F4-ETEC), in German pig farms. 24th International Pig Veterinary Congress, June 2016, Dublin, Ireland.
- Shusta, E. V., Pepper, L. R., Cho, Y. K. and Boder, E. T., 2008. A decade of yeast surface display technology: Where are we now? *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening.* 11(2): 127-134.
- Rhouma, M., Fairbrother, J. M., Beaudry, F. and Letellier, A., 2017. Post weaning diarrhea in pigs: Risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Vet Scand.* 59(1): 31.
- Rupprecht, K. R., Nair, R. K., Harwick, L. C., *et al.*, 2010. Development of a dot-blot assay for screening monoclonal antibodies to low-molecular-mass drugs. *Anal Biochem.* 407(2): 160-164.
- Smeds, A., Hemmann, K., Jakava-Viljanen, M., Pelkonen, S., Imberechts, H. and Palva, A., 2001. Characterization of the Adhesin of *Escherichia coli* F18 fimbriae. *Infect Immun.* 69(12): 7941-7945.
- Taguchi, Y. and Schatzl, H. M., 2014. Small-scale Triton X-114 Extraction of Hydrophobic Proteins. *Bio Protoc.* 4(11).
- Tiels, P., Verdonck, F., Coddens, A., Ameloot, P., Goddeeris, B. and Cox, E., 2007. Monoclonal antibodies reveal a weak interaction between the F18 fimbrial adhesin FedF and the major subunit FedA. *Vet Microbiol.* 119(2-4): 115-120.
- Tiels, P., Verdonck, F., Coddens, A., Goddeeris, B. and Cox, E., 2008. The excretion of F18+ *E. coli* is reduced after oral immunisation of pigs with a FedF and F4 fimbriae conjugate. *Vaccine.* 26(17): 2154-2163.
- Wang, Q., Li, L., Chen, M., Qi, Q. and Wang, P. G., 2007. Construction of a novel system for cell surface display of heterologous proteins on *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett.* 29(10): 1561-1566.
- Wojciechowicz, D., Lu, C. F., Kurjan, J. and Lipke, P. N., 1993. Cell surface anchorage and ligand-binding domains of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion protein alpha-agglutinin, a member of the immunoglobulin superfamily. *Mol Cell Biol.* 13(4): 2554-2563.