



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0004254

(51) **C12N 1/21; A61K 39/02**
2021.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00367

(22) 06/08/2018

(67) 1-2018-03433

(45) 25/08/2025 449

(43) 25/02/2020 383A

(73) **TRUNG TÂM CÔNG NGHỆ SINH HỌC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH (VN)**
2374, Quốc lộ 1, khu phố 2, phường Trung Mỹ Tây, quận 12, Thành phố Hồ Chí Minh

(72) Nguyễn Quốc Bình (CA); Bùi Thị Thanh Tịnh (VN).

(54) **CHỦNG VI KHUẨN EDWARDSIELLA ICTALURI ĐỘT BIẾN GEN WZZ VÀ
AROA VÀ VACXIN CHỨA CHỦNG VI KHUẨN NÀY**

(21) 2-2022-00367

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* tái tổ hợp mang gen đột biến *wzz* và *aroA* và vacxin phòng bệnh gan thận mũ do vi khuẩn *E.ictaluri* gây ra trên cá tra. Chủng vi khuẩn này không có khả năng tái độc lực và không có khả năng trở thành nguồn gây bệnh cho cá tra.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể là đề cập đến chủng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* (*E. ictaluri*) đột biến gen *wzz* và gen *aroA* và vacxin phòng bệnh gan thận mũ cho cá tra chứa chủng vi khuẩn này.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Đã biết, việc phòng ngừa bệnh gan thận mũ do vi khuẩn *E. ictaluri* gây ra trên cá tra được thực hiện bằng việc sử dụng thuốc hóa học hay kháng sinh. Điều này dẫn đến vi khuẩn *E. ictaluri* có khả năng kháng một số kháng sinh như Oxytetracyclin, Axit oxolinic, Sulphonamit, Bactrim (100%), Colistin (97,9%), Florphenicol (42,5%), Amoxicilin (40,4%), Tetracyclin (31,9%), Doxycyclin (27,7%). Ngoài ra, việc tồn dư dư lượng kháng sinh trong sản phẩm cá tra xuất khẩu cũng là một rào cản đối với xuất khẩu cá tra Việt Nam và ảnh hưởng sức khỏe người sử dụng các sản phẩm từ cá. Đồng thời, việc sử dụng kháng sinh không được kiểm soát chặt chẽ gây ô nhiễm môi trường nước.

Đã biết đến vacxin phòng bệnh gan thận mũ do vi khuẩn *E. ictaluri* gây ra trên cá tra hiện nay là vacxin bất hoạt hoặc vacxin nhược độc. Nhược điểm của vacxin bất hoạt là đòi hỏi phải sản xuất một lượng lớn tế bào, đồng thời, dù có hiệu quả trong việc kích thích sinh kháng thể nhưng hiệu quả tạo đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào không cao. Mặt khác, vacxin bất hoạt đòi hỏi phải tiêm cho cá. Đây là điều không thể thực hiện được đối với cá bột.

Hiện nay, thế giới cũng đã có các loại vacxin nhược độc chứa vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen *aroA*, *purA*, gen *chon A, B, C*. Các loại vacxin này có thể sử dụng trên cá bột bằng phương pháp ngâm.

Hiện nay, tại Trung tâm CNSH TP. HCM đã được cấp bằng độc quyền sáng chế số 14407 về “Chủng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* giảm độc lực mang gen *wzz* đột biến và vacxin chứa chủng vi khuẩn này”. Vacxin chứa chủng vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* (vacxin WzM) có thể sử dụng trên các giai đoạn của cá. Tuy nhiên, quá trình thử nghiệm trên một số chủng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* hoang dại độc lực cao cho thấy hiệu quả bảo vệ của vacxin WzM chưa cao.

Hiện nay, trên thế giới vẫn chưa nghiên cứu tạo chủng vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến cả hai gen *wzz* và *aroA* và vacxin chứa chủng vi khuẩn này.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là khắc phục được nhược điểm của các loại vacxin bất hoạt, nhược độc đã biết. Để đạt được mục đích đó, giải pháp hữu ích đề xuất tạo chủng vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến cả hai gen *wzz* và *aroA* (chủng WzLM-AroM) và vacxin chứa chủng vi khuẩn này (vacxin WzLM-AroM) có độ an toàn, có khả năng gây đáp ứng miễn dịch cao trên cá tra để phòng bệnh gan thận mù. Vacxin WzLM-AroM có thể được sử dụng dưới dạng tiêm, ngâm hoặc cho ăn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarosa 1,2% của ADN bộ gen vi khuẩn *E. ictaluri*. Trong đó, ở hình A Giếng 1: thang ADN 1000 bp; Giếng 2: sản phẩm khuếch đại với cặp mồi FUwzz/RUwzz; Giếng 3: đối chứng âm. Ở hình 1B Giếng 1: sản phẩm khuếch đại với cặp mồi FDwzz/RDwzz; Giếng 2: đối chứng âm; Giếng 3: thang ADN 1000 bp.

Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen kháng kháng sinh kanamicin trên gel agarosa 1,2%. Trong đó, Giếng 1: Thang ADN 1000 bp; giếng 2: Sản phẩm khuếch đại với cặp mồi FKm và RKm; Giếng 3: đối chứng âm.

Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm cắt pJET1.2 mang gen *wzz* đột biến bằng *KpnI* và *SacI* trên gel agarosa 1,2%. Trong đó, giếng 1: Thang ADN 1000 bp; Giếng 2: đối chứng âm pJET1.2::UKDwzz chưa cắt; Giếng 3: Vector pJET1.2 mang gen *wzz* đột biến cắt bằng *KpnI* và *SacI*.

Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm pGP704 mang gen *wzz* đột biến cắt bằng enzym *KpnI* và *SacI* trên gel agarosa 1%. Trong đó, Giếng 1: Thang ADN giếng 2: đối chứng âm vector không cắt; Giếng 3: Vector cắt bằng *KpnI* và *SacI*.

Hình 5. Kết quả điện di trên gel agarosa 1,0% của sản phẩm PCR khuẩn lạc sau khi tiếp hợp được khuếch đại từ cặp mồi FKm và RKm (hình A); FUwzz và RDwzz (hình B). Trong đó: ở hình (A); 1: Thang ADN; 2-5: sản phẩm PCR của 4 khuẩn lạc *E. ictaluri* sau khi tiếp hợp; 6: *E.coli* SM10λ *pir* chứa pGP704 mang gen *wzz* đột biến; 7: *E. ictaluri* 5H; 8: đối chứng âm. Ở hình (B); 1: Thang ADN; 2-5: sản phẩm PCR của 4 khuẩn lạc *E. ictaluri* sau khi tiếp hợp; 6: *E. ictaluri* 5H; 7: đối chứng âm.

Hình 6. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc sau khi biến nạp vector pCP20 vào chủng đột biến *wzz* bằng cặp mồi FUwzz/RDwzz. Trong đó, 1: Thang ADN 1kb; 2

khuẩn lạc *E. ictaluri* đột biến *wzz* sau khi biến nạp; 3, đối chứng *E. ictaluri* đột biến *wzz* chưa biến nạp pCP20; 4, đối chứng chủng *E. ictaluri* hoang dại; 4: đối chứng âm.

Hình 7. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarosa 1,2% của ADN bộ gen vi khuẩn *E. ictaluri*. Trong đó, ở hình A Giếng 1: thang ADN 1000 bp; Giếng 2: sản phẩm khuếch đại với cặp mồi Fhypo/Rhypo; Giếng 3: sản phẩm khuếch đại với cặp mồi Fcyki/Rcyki.

Hình 8. Kết quả điện di sản phẩm cắt pJET1.2 mang gen *aroA* đột biến bằng *EcoRI* và *SaII* trên gel agarosa 1,2%. Trong đó, giếng 1: đối chứng âm pJET1.2::cyki-K-hypo chưa cắt; Giếng 2: Vector pJET1.2 mang gen *aroA* đột biến cắt bằng *EcoRI* và *SaII*; Giếng 3: Thang ADN 1000 bp.

Hình 9. Kết quả điện di sản phẩm pGP704 mang gen *aroA* đột biến cắt bằng enzym *BglII* trên gel agarosa 1%. Trong đó, Giếng 1: Thang AND; Giếng 2: Vector cắt bằng *BglII* Giếng 3: đối chứng âm vector không cắt.

Hình 10. Kết quả điện di trên gel agarosa 1,0% của sản phẩm PCR khuẩn lạc sau khi tiếp hợp được khuếch đại từ cặp mồi Fcyki/Rhypo (hình A); FaroEI1 và RaroEI1 (hình B); FKm và RKm (hình C). Trong đó, 1: Thang ADN (20 kb), 2-7: sản phẩm PCR của 6 khuẩn lạc *E. ictaluri* sau khi tiếp hợp; 8: *E.coli* SM10λ *pir* chứa pGP704 mang gen *aroA* đột biến; 9: *E. ictaluri* 5H; 10: đối chứng âm.

Hình 11. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc sau khi biến nạp vector pCP20 vào chủng đột biến *wzz* và *aroA* bằng cặp mồi FUwzz/RDwzz (hình A) và Fcyki/Rhypo (hình B). Trong đó, 1: Thang ADN 1kb; 2 khuẩn lạc *E. ictaluri* đột biến *wzz* và *aroA* sau khi biến nạp; 3, đối chứng *E. ictaluri* đột biến *wzz* và *aroA* chưa biến nạp pCP20; 4, đối chứng chủng *E. ictaluri* hoang dại; 5: đối chứng âm.

Hình 12. Cấu trúc vector pCAMBIA 1300 mang gen kháng kháng sinh kanamicin.

Hình 13. Cấu trúc vector pGP704.

Hình 14. Cấu trúc vector pCP20.

Hình 15 là Biểu đồ 1 thể hiện tỷ lệ cá chết tích lũy theo ngày của thử nghiệm đánh giá độc lực chủng WzLM bằng phương pháp ngâm.

Hình 16 là Biểu đồ 2 thể hiện tỷ lệ cá chết trung bình của thử nghiệm đánh giá độc lực chủng WzLM bằng phương pháp ngâm.

Hình 17 là Biểu đồ 3 thể hiện tỷ lệ cá chết tích lũy theo ngày của thử nghiệm đánh giá độc lực chủng WzLM-AroM bằng phương pháp ngâm.

Hình 18 là Biểu đồ 4 thể hiện tỷ lệ cá chết trung bình của thử nghiệm đánh giá độc lực chủng WzLM-AroM bằng phương pháp ngâm.

Hình 19 là Biểu đồ 5 thể hiện tỷ lệ cá chết tích lũy theo ngày của thử nghiệm đánh giá hiệu quả bảo vệ chủng WzLM-AroM bằng phương pháp ngâm một lần trên cá giống.

Hình 20 là Biểu đồ 6 thể hiện tỷ lệ cá chết trung bình của thử nghiệm đánh giá hiệu quả bảo vệ chủng WzLM-AroM bằng phương pháp ngâm một lần trên cá giống.

Hình 21 là Biểu đồ 7 thể hiện tỷ lệ cá chết tích lũy theo ngày của thử nghiệm đánh giá hiệu quả bảo vệ chủng WzLM-AroM bằng phương pháp ngâm kết hợp trên cá bột, cá giống.

Hình 22 là Biểu đồ 8 thể hiện tỷ lệ cá chết trung bình của thử nghiệm đánh giá hiệu quả bảo vệ chủng WzLM-AroM bằng phương pháp ngâm kết hợp trên cá bột, cá giống.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Trong phạm vi của giải pháp hữu ích, chủng vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến cả hai gen *wzz* và *aroA* (chủng WzLM-AroM) và vaccin phòng bệnh gan thận mũ trên cá tra chứa chủng vi khuẩn này (vaccin WzLM-AroM) sẽ được bộc lộ rõ ràng ở đây thông qua các phương pháp thực hiện giải pháp hữu ích.

Hiện nay, việc tạo chủng nhược độc thường được thực hiện theo hướng tạo ra các đột biến bằng tác nhân vật lý (nhiệt độ, tia UV), hóa học (hóa chất, kháng sinh), hoặc bằng phương pháp sinh học phân tử (bất hoạt gen). Trong đó, phương pháp bất hoạt gen được sử dụng để bất hoạt các gen độc tính hoặc các gen cần thiết cho quá trình sinh dưỡng của vi khuẩn trong vật chủ. Các chủng vi khuẩn này vẫn có thể kích thích hệ thống miễn dịch của vật chủ theo con đường gây bệnh của chủng hoang dại nhưng không đủ độc lực để làm chết vật chủ. Vì vậy, bất hoạt gen là một phương pháp rất hữu dụng trong việc tạo chủng vi khuẩn đột biến nhược độc.

Chiều dài của kháng nguyên O ảnh hưởng đến cách vi khuẩn Gram âm tương tác với các protein bề mặt của hệ miễn dịch tự nhiên. Kháng nguyên O càng dài sẽ ngăn chặn bề mặt tiếp cận với bề mặt tế bào để ly giải vi khuẩn. Những chủng đột biến bị mất hoàn toàn kháng nguyên O dễ dàng bị tiêu diệt bởi bề mặt hơn so với chủng hoang dại. Do đó, chiều dài kháng nguyên O có đóng vai trò quan trọng trong độc tính của vi khuẩn. Chiều dài kháng nguyên O được điều hòa bởi gen *wzz*. Nghiên cứu ở các loài vi khuẩn Gram âm khác như *E. coli*, *Salmonella*, *Yersinia*... cho thấy khi chủng vi khuẩn đột biến gen *wzz* thì kháng nguyên O sẽ phân bố chiều dài chuỗi một cách ngẫu nhiên và có độc tính thấp hơn

so với chủng hoang dại (Franco và cộng sự, 1998; Murray và cộng sự, 2003; Faridmoayer và cộng sự, 2007; Kintz và cộng sự, 2008; Najdenski và cộng sự, 2008). Đối với vi khuẩn *E. ictaluri*, kháng nguyên O được chứng minh là một kháng nguyên mạnh và là yếu tố gây độc quan trọng. Vì vậy, việc loại bỏ toàn bộ gen *wzz* sẽ làm giảm khả năng gây độc của vi khuẩn *E. ictaluri*.

Ngoài ra, gen *aro* có vai trò chủ đạo trong quy trình sinh tổng hợp các amino acid nhân thơm (shikimate pathway). Các vi khuẩn khi có những sai lệch ổn định trong gen *aro* sẽ bị mất độc tính do không tạo được chorismate, sản phẩm cuối của shikimate pathway. Chorismate là tiền chất đưa vào con đường tổng hợp cuối sản xuất các amino axit nhân thơm như folat, menaquinon, ubiquinon và ca-techolate siderophores (Pittard 1996). Vi khuẩn đột biến gen *aro* cần được cung cấp chorismate hoặc các chất chuyển hóa trung gian như 3-Dihydroxybenzoic (DHB) acid, p-aminoben-OIC acid (PABA), và p-hydroxybenzoic (HB) acid để sản xuất các sản phẩm thiết yếu trên. Vì chorismate, DHB, PABA, và HB không hoặc chỉ tồn tại ở nồng độ thấp của các mô động vật có xương sống, nên các chủng đột biến vẫn giữ nguyên độc lực cần thiết để xâm nhập và gây nhiễm bệnh nhưng bị hạn chế khả năng sinh sản trong vật chủ.

Gen mục tiêu phổ biến nhất được quan tâm là *aroA*, mã hóa enzym 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. Các trình tự gen *aroA* của một số tác nhân gây bệnh gram (-) đã được công bố, và đột biến gen *aroA* đã chứng minh là có hiệu quả trong ứng dụng vaccine.

Vì vậy, trong giải pháp hữu ích này chúng tôi đề nghị việc đột biến cả hai gen *wzz* và *aroA* để làm giảm độc lực của chủng *E. ictaluri*.

Chủng *E. ictaluri* đột biến cả hai gen *wzz* và *aroA* theo giải pháp hữu ích là nhược độc. Vacxin chứa chủng vi khuẩn này theo giải pháp hữu ích có khả năng phòng ngừa bệnh gan thận mủ trên cá tra.

Theo một phương án, giải pháp hữu ích đề xuất chủng vi khuẩn *E. ictaluri* mang đột biến cả hai gen *wzz* và *aroA*, trong đó gen *wzz* được loại bỏ hoàn toàn. Chủng vi khuẩn theo giải pháp hữu ích được tạo ra bằng cách bất hoạt gen *wzz* và *aroA* theo phương pháp tái tổ hợp tương đồng. Cụ thể, quá trình tạo chủng vi khuẩn theo giải pháp hữu ích được thực hiện theo các bước sau:

1. Tạo chủng vi khuẩn *E. ictaluri* mang đột biến gen *wzz*

a. Tạo dòng tế bào *E. coli* SM10 λ pir mang vectơ chứa gen *wzz* đột biến

Chủng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* dùng cho nghiên cứu này là phân lập và xác định độc lực bởi phòng Công nghệ sinh học Thủy sản, Trung tâm Công nghệ sinh học TP. Hồ Chí Minh từ cá tra bị bệnh gan thận mũ ở tỉnh Tiền Giang

Chủng vi khuẩn *Escherichia coli* DH5 α (*E. coli* DH5 α) được cung cấp bởi hãng Invitrogen, Hoa Kỳ. *E. coli* DH5 α là chủng được cải tiến từ chủng *E. coli* tự nhiên, có những thiếu hụt dùng để biến nạp và nhân nhanh số lượng bản sao vector hoặc cosmid. Đây là một chủng rất tốt để làm vật chủ bảo tồn và nhân bản vector.

Chủng vi khuẩn *Escherichia coli* SM10 λ pir (*E. coli* SM10 λ pir) được cung cấp bởi hãng Biomedal, Tây Ban Nha. *E. coli* SM10 λ pir là chủng được cải tiến từ chủng *E. coli* tự nhiên, có chứa gen *pir* mã hóa cho protein II cần thiết cho sự nhân lên của vector pGP704.

Vector pGP704 (tặng bởi đại học Harvard) có chứa gen *Amp^R*, đã được loại bỏ điểm khởi đầu của sự sao chép oriE1, có chứa điểm khởi đầu sao chép R6K (*oriR6K*). pGP704 không nhân lên được trong tế bào bình thường mà đòi hỏi tế bào có chứa gen *pir* mã hóa cho protein II.

Vector pCP20 (được tặng bởi đại học Yale) có chứa gen mã hóa cho enzym FLP recombinaza – loại enzym có chức năng thực hiện quá trình tái tổ hợp tương đồng. Đây là loại vector chuyên dụng để bất hoạt gen bằng phương pháp tái tổ hợp tương đồng. Quá trình tái bản của vector pCP20 nhạy cảm với nhiệt độ, do đó có thể dễ dàng loại bỏ nó ra khỏi tế bào đã biến nạp bằng cách nuôi cấy ở 42°C.

Các đoạn môi sử dụng:

F2A *serC*: 5'- TCTGGTTCTGGCCGAATATGGACTC - 3'

R2A *serC*: 5'- CGTAATCAAACCAACACCGGGTATT - 3'

WF1: 5'-GTCGACATGGTGAGTCAAAATCCGATGC-3'

WR1: 5'-GAATTCTCAGATCCGTGCACGACG-3'

FUwzz: 5' – AAGGTACCGTACCCTGATCGGCTTTACC – 3'

RUwzz: 5' – AAGGATCCGGTTTTCCCTTTATGGCCGA – 3'

FDwzz: 5' – AAGGATCCGGATCGGCGGTAACAAAAGA – 3'

RDwzz: 5' – AAGAGCTCACCGGAATTCGCTGGTAAAA – 3'

FUwzz: 5' – AAGGTACCGTACCCTGATCGGCTTTACC – 3'

RDwzz: 5' – AATCTAGAACCGGAATTCGCTGGTAAAA – 3'

FOwzz: 5' – CAACGCCTTTAATATGGTGGAC – 3'

ROwzz: 5' – GTCCAAAAACGGGTAGGCTG – 3'

FFRTK : 5' -

AAGGATCCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAA
CTTCCCAGCCAGCCAA -3'

RFRTK : 5'-

AAGGATCCAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACT
TCCTAAAACAATTCATCCAGT -3'

Từ trình tự gen *wzz* (AF110153) của *E. ictaluri* (NC_012779) được nêu trong SED ID No:1 (dài 1038 bp), các cặp mồi WF1/WR1, FU_{wzz}/RU_{wzz}, FD_{wzz}/RD_{wzz} được thiết kế để khuếch đại lần lượt các đoạn ADN bao gồm: gen *wzz*, đoạn trước gen *wzz* (U_{wzz}) được nêu trong SED ID No:2 (dài 460 bp) và đoạn sau gen *wzz* (D_{wzz}) được nêu trong SED ID No:3 (dài 368 bp).

Các đoạn gen *wzz* (SED ID No:1), U_{wzz} (SED ID No:2) và D_{wzz} (SED ID No:3) được chèn vào trong vectơ pJET1.2 đầu bằng (Fermentas, Hoa Kỳ), biến nạp và nhân dòng trong *E. coli* DH5 α và giải trình tự. Ngoài ra, trình tự mã hóa gen kháng kháng sinh kanamicin từ vectơ pCambia được nêu trong SED ID No:4 (dài 1219 bp) cũng được khuếch đại và nhân dòng trong tế bào *E. coli* DH5 α và giải trình tự. Tuy nhiên, cặp mồi dùng trong PCR trình tự gen kháng kháng sinh kanamicin được bổ sung thêm trình tự FRT cho sản phẩm khuếch đại là đoạn gen kháng kanamicin có đoạn FRT ở hai đầu (FRTK) với tổng kích thước 1325 bp (SED ID No:5). Đây là vị trí nhận biết của enzym tái tổ hợp Flippaza (FLP), được sử dụng vì mục đích loại bỏ gen kháng sinh sau khi đã tạo được chủng *E. ictaluri* đột biến.

Các thao tác cắt nối gen được tiến hành để tạo trình tự gen *wzz* đột biến với thứ tự “đoạn trước gen *wzz* – gen kháng kháng sinh kanamicin – đoạn sau gen *wzz*”. Trình tự gen đột biến này được chèn vào vectơ GP704, biến nạp vào *E. coli* SM10 λ *pir*. Vectơ GP704 đã được loại bỏ điểm khởi đầu của sự sao chép (*oriE1*) nhưng mang điểm khởi đầu của sự sao chép R6K (*oriR6K*), không nhân lên được trong tế bào bình thường mà đòi hỏi phải có protein Π mã hóa từ gen *pir*, hiện diện trong *E. coli* SM10 λ *pir*.

b. Tiếp hợp *E. ictaluri* với *E. coli* SM10 λ *pir* mang vectơ chứa gen *wzz* đột biến

Gen biến đổi chuyển vào vectơ pGP704, biến nạp vào *E. coli* SM10 λ *pir*. Trộn chung *E. coli* SM10 λ *pir* với *E. ictaluri* hoang dại, chuyển lên màng để thực hiện phản ứng lai, sau khi lai, gen biến đổi có thể xác nhập vào bộ gen nhiễm sắc thể bằng tái tổ hợp tương

đồng mà có sự trao đổi chéo giữa gen trên vector và gen tương ứng trên nhiễm sắc thể. Sự chọn lọc này trên môi trường LB có chứa kháng sinh kanamicin và colistin. Vì vector pGP704 không tự nhân lên được trong chủng nhận *E. ictaluri* nên tất cả các khuẩn lạc *E. ictaluri* mọc trên môi trường có chứa kháng sinh đã có gen đột biến.

Xác định kiểu gen và kiểu hình của chủng mang gen đột biến. Thiết kế các cặp mồi để kiểm tra các chủng *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* và *E. ictaluri* hoang dại với các cặp mồi FOWzz/ROwzz, FUwzz và RDwzz với sản phẩm khuếch đại tương ứng khoảng 2400 bp và 1936 bp đối với chủng hoang dại. Ngược lại thì chủng đột biến có kích thước sản phẩm khuếch đại lớn hơn lần lượt là 2649 và 2169 bp. Đối với cặp mồi F1 pGP704 và R1 pGP704 thì cả hai đều cho kết quả âm tính. Đối với cặp mồi WF1 và WR1 cho sản phẩm 1050 bp với chủng hoang dại và không cho kết quả với chủng đột biến. Đối với cặp mồi FFRTK và RFRTK cho sản phẩm 1325 bp đối với chủng đột biến nhưng không cho kết quả với chủng hoang dại. Môi trường nuôi cấy là môi trường LB rắn chứa kháng sinh thích hợp, kanamicin và colistin. Vì vector pGP704 không tự nhân lên được trong chủng nhận *E. ictaluri* và *E. coli* không mọc trên môi trường có kháng sinh colistin nên các khuẩn lạc *E. ictaluri* mọc trên môi trường có chứa kanamicin là các chủng có chứa gen kháng kanamicin được tái tổ hợp tương đồng vào vị trí gen *wzz* đã bị loại bỏ.

c. Loại bỏ gen kháng kanamicin ra khỏi bộ gen của vi khuẩn *E. ictaluri*

Sau khi đã xác định chủng *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* (chủng WzLM), chúng tôi tiến hành biến nạp vector pCP20 vào chủng WzLM với mục đích sử dụng vector này loại gen kháng kháng sinh kanamicin khỏi bộ gen của vi khuẩn. Vector pCP20 có chứa gen mã hóa cho enzym FLP. Enzym này kích hoạt hệ thống tái tổ hợp tương đồng nhận biết hai đoạn FRT được thiết kế tương đồng ngược chiều trong đoạn FRTK dẫn đến việc đoạn ADN mã hóa gen kháng kháng sinh kanamicin nằm giữa hai đoạn FRT được loại bỏ. Các khuẩn lạc sau khi biến nạp mọc trên môi trường được PCR kiểm tra bằng phương pháp PCR. Kết quả điện di cho thấy tất cả các khuẩn lạc được kiểm tra ngẫu nhiên đều có một vạch duy nhất tương đương 886 bp, kích thước sản phẩm dự kiến khi gen mục tiêu kháng kháng sinh kanamicin đã được loại bỏ. Trong khi kích thước khuếch đại của chủng đột biến trước khi loại bỏ gen kháng sinh bị bất hoạt vì mất đi toàn bộ gen *wzz* và không thể kiểm soát được quá trình sinh tổng hợp kháng nguyên O.

Đặc điểm của chủng vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* theo giải pháp hữu ích là gen *wzz* bị bất hoạt nên quá trình sinh tổng hợp kháng nguyên O bị rối loạn. Điều này là cho chủng bị giảm khả năng gây độc trên cá tra (chủng nhược độc).

Hiện tại, chủng vi khuẩn *E. ictaluri* nhược độc đột biến gen *wzz* sau khi được tạo thành sẽ được bảo quản trong môi trường Brain Heart Infusion (môi trường BHI) có bổ sung glycerol 10% và trữ trong tủ lạnh sâu -80°C tại Trung tâm Công nghệ sinh học TP. Hồ Chí Minh với số hiệu lưu giữ 02.

Sau khi tạo được chủng vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* (chủng WzLM), tiến hành quá trình thử nghiệm độc lực của chủng vi khuẩn này như sau:

Quy trình thử nghiệm được bố trí hiện theo bảng 1 và thực hiện tại phòng Công nghệ sinh học Thủy sản, Trung tâm Công nghệ sinh học TP. Hồ Chí Minh.

Tên chủng		Chủng hoang dại 5H	Chủng WzLM
		Cá 10g/con	Cá 10g/con
Thử nghiệm độc lực (ở các nồng độ vi khuẩn khác nhau)	Ngâm	10 ⁵ , 10 ⁶ , 10 ⁷ CFU/mL	10 ⁵ , 10 ⁶ , 10 ⁷ CFU/mL

Kết quả thử nghiệm cho thấy, cá chết ở nghiệm thức ngâm chủng *E. ictaluri* mang đột biến gen *wzz* (chủng WzLM) là 10% (10⁵CFU/ml), 37% (10⁶ CFU/ml) và 95% (10⁷CFU/ ml). Trong khi, tỷ lệ cá chết ở nghiệm thức ngâm chủng *E. ictaluri* hoang dại (chủng 5H – Thu tại tỉnh An Giang) lần lượt là 30% (10⁵CFU/ ml), 65% (10⁶CFU/ ml), 100% (10⁷CFU/ ml). Chủng WzLM có độc lực thấp hơn (nhược độc) so với chủng 5H. Tuy nhiên, độc lực của chủng đột biến gen *wzz* còn cao. Vì vậy, đề xuất thêm một phương án là bất hoạt thêm một gen *aroA*.

2. Tạo chủng vi khuẩn *E. ictaluri* mang đột biến gen *wzz* và *aroA*

a. Tạo dòng tế bào *E. coli* SM10 λ pir mang vector chứa gen *aroA* đột biến

Các chủng vi khuẩn và vector: tương tự như trên (1.a)

Các đoạn môi sử dụng:

F2A *serC*: 5'- TCTGGTTCTGGCCGAATATGGACTC - 3'

R2A *serC*: 5'- CGTAATCAAACCAACACCGGGTATT - 3'

FaroEI: 5' – CCACCTTACGCAGCTCACTG - 3'

RaroEI: 5' – AGCGGCGAGATTAATCTGC - 3'

Fcyki: 5' - AA GAATTC AGTGTTGCCGACGGTTTC - 3'

Rcyki: 5' - AA GGATCC GCCGCATTAGGATTTTATCTG - 3'

Fhypo: 5' - AA GGATCC GCTAAATCACTCCTGC - 3'

Rhypo: 5' - AA GTCGAC TTTTTTATCAGAGTTTGGGATC - 3'

FFRTK: 5' -

AAGGATCCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAA
CTTCCCAGCCAGCCAA -3'

RFRTK : 5'-

AAGGATCCAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACT
TCCTAAAACAATTCATCCAGT -3'

Trình tự gen *aroA* của *E. ictaluri* được nêu trong SED ID No:6 dài 1287 bp, các cặp môi Fcyki/Rcyki, Fhypo/Rhypo được thiết kế để khuyết đại lần lượt các đoạn AND bao gồm: gen *aroA*, đoạn trước gen *aroA* (cyki) được nêu trong SED ID No:7 dài 603 bp và đoạn sau gen *aroA* (hypo) được nêu trong SED ID No:8 dài 550 bp.

Tương tự với gen *aroA*, các thao tác cắt nối gen được tiến hành để tạo trình tự gen *aroA* đột biến với thứ tự “đoạn trước gen *aroA* – gen kháng kháng sinh kanamicin – đoạn sau gen *aroA*”. Trình tự gen đột biến này được chèn vào vector GP704, biến nạp vào *E. coli* SM10 λ pir.

b. Tiếp hợp *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* (WzLM) với *E. coli* SM10 λ pir mang vector chứa gen *aroA* đột biến

Tiến hành tiếp hợp tương tự như gen *wzz*

Thiết kế các cặp môi để kiểm tra các chủng *E. ictaluri* đột biến gen *aroA* và *E. ictaluri* hoang dại với các cặp môi Fcyki/Rhypo và FaroEI/ RaroEI với sản phẩm khuyết đại tương ứng khoảng 2455 và 1030 bp đối với chủng hoang dại. Ngược lại thì chủng đột biến có kích thước sản phẩm khuyết đại lần lượt là 2493 bp và âm tính. Đối với cặp môi F1 pGP704 và R1 pGP704 thì cả hai đều cho kết quả âm tính. Đối với cặp môi FFRTK và RFRTK cho sản phẩm 1325 bp đối với chủng đột biến nhưng không cho kết quả với chủng hoang dại. Môi trường nuôi cấy là môi trường LB rắn chứa kháng sinh thích hợp, kanamicin và colistin. Vì vector pGP704 không tự nhân lên được trong chủng nhận *E. ictaluri* và *E. coli* không mọc trên môi trường có kháng sinh colistin nên các khuẩn lạc *E. ictaluri* mọc trên môi trường có chứa kanamicin là các chủng có chứa gen kháng kanamicin được tái tổ hợp tương đồng vào vị trí gen *aroA* đã bị loại bỏ.

c. Loại bỏ gen kháng kanamicin ra khỏi bộ gen của vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* và *aroA*

Tương tự với loại gen kháng kanamycin của gen *wzz*, chúng tôi tiến hành biến nạp vector pCP20 vào chủng vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* và *aroA* với mục đích sử dụng vector này loại gen kháng kháng sinh kanamycin khỏi bộ gen của vi khuẩn.

Kết quả điện di cho thấy tất cả các khuẩn lạc được kiểm tra ngẫu nhiên đều có một vạch duy nhất tương đương 1194 bp, kích thước sản phẩm dự kiến khi gen mục tiêu kháng kháng sinh kanamycin đã được loại bỏ. Trong khi kích thước khuếch đại của chủng đột biến trước khi loại bỏ gen kháng sinh bị bất hoạt vì mất đi toàn bộ gen *aroA* và không tạo được chorismate, sản phẩm cuối của con đường shikimate.

Đặc điểm của chủng vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* và *aroA* theo giải pháp hữu ích là gen *wzz* và *aroA* bị bất hoạt nên quá trình sinh tổng hợp kháng nguyên O bị rối loạn, và không tạo được chorismate, sản phẩm cuối của sinh tổng hợp các amino acid nhân thơm (shikimate pathway). Điều này là cho chủng bị giảm khả năng gây độc trên cá tra (chủng nhược độc).

Hiện tại, chủng vi khuẩn *E. ictaluri* nhược độc đột biến gen *wzz* và *aroA* sau khi được tạo thành sẽ được bảo quản trong môi trường Brain Heart Infusion (môi trường BHI) có bổ sung glycerol 10% và trữ trong tủ lạnh sâu -80°C tại Trung tâm Công nghệ sinh học TP. Hồ Chí Minh với số hiệu lưu giữ 02.

Sau khi tạo được chủng vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* và *aroA* (chủng WzLM-AroA), tiến hành quá trình thử nghiệm độc lực của chủng vi khuẩn này như sau:

Tên chủng		Chủng hoang dại 5H	Chủng WzLM-AroA
		Cá 10g/con	Cá 10g/con
Thử nghiệm độc lực (ở các nồng độ vi khuẩn khác nhau)	Ngâm	10^5 , 10^6 , 10^7 CFU/mL	10^5 , 10^6 , 10^7 CFU/mL

Kết quả thử nghiệm cho thấy, cá chết ở nghiệm thức ngâm *E. ictaluri* mang đột biến gen *wzz* và *aroA* (chủng WzLM-AroA) là 0% (10^5 - 10^7 CFU/ ml). Trong khi, tỷ lệ cá chết ở các lô ngâm chủng *E. ictaluri* hoang dại (chủng 5H) lần lượt là 36% (10^5 CFU/ ml), 78% (10^6 CFU/ ml), 100% (10^7 CFU/ ml). Chủng WzLM-AroA có độc lực thấp hơn (nhược độc) so với chủng 5H và hoàn toàn an toàn cho cá.

Theo một phương án khác, giải pháp hữu ích đề xuất vacxin phòng bệnh gan thận mủ cho cá tra chứa chủng vi khuẩn *E. ictaluri* mang đột biến gen *wzz* và *aroA* (vacxin WzLM-AroA)

Cách thức tạo vacxin chứa chủng vi khuẩn *E. ictaluri* mang đột biến gen *wzz* và *aroA* (vacxin WzLM-AroA)

Chủng WzLM-AroA được cấy ria trên môi trường BHI có bổ sung colistin (20 µg/ml), nuôi ở nhiệt độ 28°C, trong 48-72h. Sau đó lấy một số khuẩn lạc đơn mọc riêng lẻ đem PCR với môi FUwzz/RDwzz và Fcyki/Rhypo để khẳng định chính xác chủng cần sử dụng.

Cấy 1 khuẩn lạc chủng WzLM-AroA vào 5 ml BHI lỏng, nuôi cấy qua đêm ở điều kiện lắc 250 vòng/phút ở 28 °C, trong 16h.

Cấy chuyển tiếp 1 ml dịch nuôi cấy vào 100 ml BHI lỏng. Nuôi cấy lắc 18h điều kiện lắc 250 vòng/phút ở 28 °C.

Chuyển dịch cấy vào các falcon 50 ml lạnh. Ngâm trong đá lạnh 10 phút.

Ly tâm thu sinh khối ở 4000 vòng/phút trong 15 phút ở 2 °C, loại bỏ dịch nổi.

Huyền phù cần trong 100 ml NaCl 0,9% ở 2°C để tạo dịch vacxin WzLM-AroA huyền phù có nồng độ tương đương 10^9 CFU/ ml.

Vacxin WzLM-AroA có thể sử dụng ngay hoặc bảo quản ở 2°C tối đa trong vòng 24h trước sử dụng.

Thành phần vacxin chứa chủng vi khuẩn *E. ictaluri* mang đột biến gen *wzz* và *aroA* (vacxin WzLM-AroM)

Vacxin WzLM-AroA chứa chủng vi khuẩn *E. ictaluri* mang đột biến gen *wzz* và *aroA* (chủng WzLM-AroA) được hòa tan trong dung dịch NaCl 0,9% ở nồng độ vi khuẩn 10^9 CFU/ ml.

Đặc điểm lý hoá của vacxin WzLM-AroA

Vacxin ở dạng lỏng, màu trắng đục.

Cách thức sử dụng vacxin WzLM-AroA

Vacxin có thể sử dụng cho cá tra ở dạng ngâm. Cụ thể như sau:

- Từ dịch vacxin ban đầu có nồng độ vi khuẩn 10^9 CFU/ ml, pha loãng 10^{-2} trong nước sạch 24 – 26°C để đạt nồng độ vi khuẩn 10^7 CFU/ml.
- Ngâm cá trong vòng 30 phút ở 24 – 26°C.
- Vớt cá ra và thả lại trong bể nuôi bình thường.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Các ví dụ dưới đây chỉ nhằm minh họa các phương án thực hiện giải pháp hữu ích mà không làm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Ví dụ 1: Tạo dòng tế bào *E. coli* SM10 λ *pir* mang vector chứa gen *wzz* đột biến.

Việc tạo dòng tế bào *E. coli* SM10 λ *pir* mang vector chứa gen *wzz* đột biến được thực hiện theo thứ tự 3 bước chính sau đây: tạo dòng *E. coli* DH5 α mang vector chứa đoạn trước *Uwzz* và đoạn sau *Dwzz* của gen *wzz*, tạo dòng *E. coli* DH5 α mang vector chứa đoạn FRTK (gen kháng kháng sinh Kanamicin mang trình tự FRT), tạo dòng tế bào *E. coli* SM10 λ *pir* mang vector chứa trình tự *Uwzz* – FRTK – *Dwzz* (catxet gen *wzz* đột biến).

❖ Tạo dòng *E. coli* DH5 α mang vector chứa đoạn trước *Uwzz* và đoạn sau *Dwzz* của gen *wzz*

Khuyếch đại hai đoạn 476 bp (*Uwzz*) và 384 bp (*Dwzz*) tương ứng với hai đoạn trước và sau của gen *wzz* với cặp mồi đặc hiệu (FU*wzz*: 5' – AAGGTACCGTACCCTGATCGGCTTTACC – 3' và RU*wzz*: 5' – AAGGATCCGGTTTTCCCTTTATGGCCGA – 3'; FD*wzz*: 5' – AAGGATCCGGATCGGCGGTAACAAAAGA – 3' và RD*wzz*: 5' – AAGAGCTCACCGGAATTCGCTGGTAAAA – 3') từ 0,2 μ g ADN tổng số của chủng *E. ictaluri* 5H, 1 U *taq Dream*, 1 mM MgCl₂, 2,5 μ l đệm 10x *Dream*, 0,2 mM dNTP, còn lại bổ sung nước vô trùng cho thể tích phản ứng là 25 μ l. Phản ứng được thực hiện theo chương trình gia nhiệt gồm 95°C: 4 phút, 30 chu kỳ (95°C: 45 giây, 54°C: 1 phút, 72°C: 30 giây), 72°C: 10 phút, sau đó giữ mẫu ở 4°C). Kết quả điện di sản phẩm PCR được thể hiện ở Hình 1.

- Nối trực tiếp sản phẩm PCR hai đoạn *Uwzz* và *Dwzz* vào vector pJET1.2 đầu bằng ADN T4 ligaza. Sản phẩm của phản ứng nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α khả nạp. Các bước chuẩn bị tế bào *E. coli* DH5 α khả nạp như sau: nuôi cấy qua đêm 1 khuẩn lạc *E. coli* vào 5 ml môi trường LB lỏng ở điều kiện lắc 250 vòng/phút - 37°C; cấy chuyển 1 ml dịch nuôi cấy vào 100 ml môi trường LB lỏng và lắc 250 vòng/phút - 37°C cho đến khi giá trị OD_{600nm} khoảng 0.4, chuyển dịch nuôi cấy vào các falcon 50 ml lạnh 5 – 10 phút, ly tâm thu sinh khối tế bào ở 3000 vòng/phút trong 7 phút - 4°C, bỏ dịch nổi, huyền phù sinh khối tế bào trong 10 ml dung dịch CaCl₂ 0,1 M lạnh, ly tâm sinh khối 2700 vòng/phút trong 5 phút - 4°C, bỏ dịch nổi, huyền phù sinh khối trong 2 ml dung dịch CaCl₂ 0,1 M, chia lượng nhỏ 100 μ l vào ống 1,5 ml. Phản ứng biến nạp phản ứng nối vào tế bào *E. coli* DH5 α khả nạp được thực hiện như sau: trộn đều 10 μ l phản ứng nối vào 100 μ l tế bào *E. coli* DH5 α khả nạp, giữ trong bể đá 10 phút, chuyển nhanh dịch tế bào trên vào bể ổn nhiệt

42°C trong 2 phút, nhanh chóng chuyển dịch tế bào vào bể đá trong 1 – 2 phút, cho vào 250 µl môi trường LB, nuôi cấy lắc ở 37°C - 1 giờ, lấy 100 µl dịch nuôi cấy trải trên môi trường LB aga chứa ampicillin (50 µg/ ml), ủ 37°C. Sau 16h, thu được các dòng *E. coli* DH5α chứa vector pJET1.2 đầu bằng tái tổ hợp lần lượt mang đoạn *Uwzz* và *Dwzz*.

❖ Tạo dòng *E.coli* DH5α mang vector chứa đoạn gen kháng kháng sinh kanamicin

– Dựa vào trình tự gen *Km^R* từ AF234296 của ngân hàng gen (NCBI), chúng tôi thiết kế cặp môi *FKm/RKm* có gắn trình tự *BamHI* và FRT (108 bp) vì mục đích loại bỏ gen kháng sinh Kanamicin sau khi tạo thành công chủng đột biến (*FKm*: 5'-AAGGATCCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTTCCCAGCCAGCCAA -3' và *RKm* : 5'-AAGGATCCAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCCTAAAACAATTCATCCAGT -3'). Vì vậy, chiều dài của sản phẩm khuếch đại tương ứng của cặp môi *FKm/RKm* là một đoạn trình tự (FRTK) 1325 bp gồm 1219 bp gen *Km^R* và 106 bp FRT. Khuếch đại trình tự FRTK bằng cặp môi *FKm/RKm* từ 0,2µg ADN vector họ pCAMP1A, 1 U *taq Dream*, 1 mM MgCl₂, 2,5 µl đệm 10x *Dream*, 0,2 mM dNTP, còn lại bổ sung nước vô trùng cho thể tích phản ứng là 25 µl. Phản ứng được thực hiện theo chương trình gia nhiệt gồm 95°C: 4 phút, 30 chu kỳ (95°C: 45 giây, 60°C: 1 phút, 72°C: 1 phút 15 giây), 72°C: 10 phút, sau đó giữ mẫu ở 4°C). Kết quả điện di sản phẩm PCR được thể hiện ở Hình 2.

– Nối trực tiếp sản phẩm PCR đoạn FRTK vào vector pJET1.2 đầu bằng bằng ADN T4 ligaza. Sản phẩm của phản ứng nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5α khả nạp. Các bước chuẩn bị tế bào *E. coli* DH5α khả nạp bằng CaCl₂ 0,1 M tương tự như ở bước tạo dòng hai đoạn *Uwzz* và *Dwzz* đã trình bày. Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5α khả nạp được thực hiện như sau: trộn đều 10µl phản ứng nối vào 100µl tế bào *E. coli* DH5α khả nạp, giữ trong bể đá 10 phút, chuyển nhanh dịch tế bào trên vào bể ổn nhiệt 42°C trong 2 phút, nhanh chóng chuyển dịch tế bào vào bể đá trong 1 – 2 phút, cho vào 250 µl môi trường LB, nuôi cấy lắc ở 37°C - 1 giờ, lấy 100µl dịch nuôi cấy trải trên môi trường LB aga chứa ampicillin (50 µg/ ml) và kanamicin (50 µg/ ml), ủ 37°C. Sau 16h, thu được các dòng *E. coli* DH5α chứa vector pJET1.2 đầu bằng tái tổ hợp lần lượt mang đoạn FRTK.

❖ Tạo dòng tế bào *E. coli* SM10 λ pir mang vector chứa trình tự *Uwzz* – FRTK – *Dwzz* (gen *wzz* đột biến)

Với mục đích tạo catxet gen *wzz* đột biến bao gồm đoạn trước *Uwzz*, đoạn sau *Dwzz* và gen kháng kháng sinh kanamicin FRTK, các vector pJET1.2 đầu bằng tái tổ hợp mang các trình tự tương ứng được thao tác theo thứ tự sau:

- Tạo vector pJET1.2 đầu bằng tái tổ hợp mang cả hai trình tự *Uwzz* – *Dwzz*: vector pJET1.2 đầu bằng tái tổ hợp mang riêng biệt trình tự *Uwzz* và *Dwzz* được cắt đồng thời bằng enzym giới hạn *Bam*HI và *Not*I. Sản phẩm cắt được điện di trên gel agarosa 1% và tinh sạch đoạn vector pJET1.2 đầu bằng mang *Uwzz* mở vòng và đoạn *Dwzz*. Nối hai sản phẩm tinh sạch này với tỉ lệ 1/3 (vector chứa *Uwzz* /đoạn *Dwzz*) bằng enzym ADN T4 ligaza. Sản phẩm nối được biến nạp vào *E. coli* DH5 α khả nạp với các bước tiến hành như đã mô tả ở trên. Sinh khối sau khi biến nạp được trải trên đĩa LB aga chứa ampicillin (50 μ g/ ml), ủ 37°C. Sau 16h, thu được các dòng *E. coli* DH5 α chứa vector pJET1.2 đầu bằng tái tổ hợp lần lượt mang cả hai trình tự *Uwzz* – *Dwzz*.
- Tạo vector pJET1.2 đầu bằng tái tổ hợp mang trình tự *Uwzz* – FRTK – *Dwzz* (gen *wzz* đột biến): vector pJET1.2 đầu bằng tái tổ hợp mang cả hai trình tự *Uwzz* - *Dwzz* và vector pJET1.2 đầu bằng mang FRTK được cắt đồng thời bằng enzym giới hạn *Bam*HI. Sản phẩm cắt được điện di trên gel agarosa 1% và tinh sạch đoạn vector pJET1.2 đầu bằng mang *Uwzz* - *Dwzz* mở vòng và đoạn FRTK. Nối hai sản phẩm tinh sạch này với tỉ lệ 1/3 (vector chứa *Uwzz* - *Dwzz*/đoạn FRTK) bằng enzym ADN T4 ligaza. Sản phẩm nối được biến nạp vào *E. coli* DH5 α khả nạp với các bước tiến hành như đã mô tả ở trên. Sinh khối sau khi biến nạp được trải trên đĩa LB aga chứa ampicillin (50 μ g/ ml) và kanamicin (50 μ g/ ml), ủ 37°C. Sau 16h, thu được các dòng *E. coli* DH5 α chứa vector pJET1.2 đầu bằng tái tổ hợp mang catxet gen *wzz* đột biến. Sự hiện diện của catxet trong vector này được kiểm tra bằng phương pháp điện di phản ứng cắt vector với enzym cắt giới hạn *Kpn*I và *Sac*I ở Hình 3.
- Tạo vector pGP704 tái tổ hợp mang trình tự *Uwzz* – FRTK – *Dwzz* (catxet gen *wzz* đột biến): Để thực hiện tiếp hợp, gen đột biến cần được chuyển sang plamid có khả năng di động từ chủng cho sang chủng nhận. Ngoài ra, vector di động này cần phải có đặc tính chỉ tồn tại trong một loại tế bào nhất định nhờ vào một hệ thống mà tế bào chủng nhận như *E. ictaluri* không chứa yếu tố tương tự. Vector pGP704 có chứa gen kháng Ampicillin, không có điểm khởi đầu của sự sao chép (*oriE1*) nhưng mang điểm khởi đầu của sự sao chép R6K (*oriR6K*). Vector này thuộc loại vector tự hủy không nhân lên được trong tế bào bình thường mà đòi hỏi phải có protein Π mã hóa từ gen *pir*. Vì vậy, vector pJET1.2 đầu bằng mang catxet chứa gen *wzz* đột biến và vector pGP704 được cắt bằng enzym cắt giới hạn

KpnI và *SacI*. Sản phẩm cắt được điện di trên gel agarosa 1% và vector pGP704 và đoạn catxet gen *wzz* đột biến được tinh sạch. Nối hai sản phẩm tinh sạch này với tỉ lệ 1/3 (vector pGP704/ catxet gen *wzz* đột biến) bằng enzym ADN T4 ligaza. Sản phẩm nối được biến nạp vào *E. coli* SM10 λ *pir* khả nạp với các bước tiến hành như đã mô tả đối với phương pháp biến nạp *E. coli* DH5 α . Sinh khối sau khi biến nạp được trải trên đĩa LB aga chứa ampicillin (50 μ g/ ml) và kanamicin (50 μ g/ ml), ủ 37°C. Sau 16h, thu được các dòng *E. coli* SM10 λ *pir* chứa vector pGP704 tái tổ hợp lần lượt mang catxet gen *wzz* đột biến. Sự hiện diện của catxet gen *wzz* đột biến trong vector pGP704 được khẳng định bằng phương pháp điện di phản ứng cắt vector với enzym cắt giới hạn *KpnI* và *SacI* ở Hình 4.

Ví dụ 2: Tiếp hợp *E. ictaluri* với *E. coli* SM10 λ *pir* mang vector chứa gen *wzz* đột biến.

Mục tiêu của tiếp hợp nhằm tạo điều kiện cho vector pGP704 mang gen *wzz* đột biến được chuyển từ *E. coli* SM10 λ *pir* (chúng cho) vào *E. ictaluri* (chúng nhận). Trộn chủng *E. coli* SM10 λ *pir* mang gen *wzz* biến đổi hiện diện trên vector pGP704 và *E. ictaluri* hoang dại AG, chuyển lên màng để thực hiện phản ứng lai. Sau khi lai, gen biến đổi có thể xác nhập vào bộ gen nhiễm sắc thể bằng tái tổ hợp tương đồng mà có sự trao đổi chéo giữa gen trên vector và gen tương ứng trên nhiễm sắc thể. Sự chọn lọc này trên môi trường BHI có chứa kháng sinh kanamicin và colistin. Vì vector pGP704 không tự nhân lên được trong chủng nhận *E. ictaluri* nên tất cả các khuẩn lạc *E. ictaluri* mọc trên môi trường có chứa kháng sinh đã có gen đột biến. Quy trình thí nghiệm được thực hiện cụ thể như sau:

- Nuôi chủng nhận *E. ictaluri* hoang dại (chủng 5H) trên môi trường BHI lỏng có bổ sung 5 ml MgSO₄ (10 mM), 2mg albumin huyết thanh bò (BSA)/ ml, 10 μ g ADNaza I/ ml.
- Nuôi chủng cho *E. coli* SM10 λ *pir* mang vector pGP704 mang gen *wzz* đột biến
- Trộn chủng 5H với *E. coli* SM10 λ *pir* lần lượt theo tỉ lệ 10:1
- Cho vào 5 ml MgSO₄ (10 mM), 2 mg albumin huyết thanh bò (BSA)/ ml và 10 μ g ADNaza I/ ml
- Chuyển 2-3 ml dung dịch trộn lên màng lai cellulose acetate (kích thước lỗ lọc 0,45 μ m, đường kính màng 33 mm; hãng Millipore)
- Đặt màng lai lên trên môi trường BHI aga, phủ lên 5 mm aga và ủ 28°C trong 4h.
- Huyền phù vi khuẩn trong trên môi trường BHI lỏng có bổ sung 5 ml MgSO₄ (10 mM), 2 mg albumin huyết thanh bò (bovine serum albumin - BSA)/ ml và 10 μ g ADNaza I/ ml

- Votex 10 giây
- Pha loãng, trải đĩa và chọn lọc *E. ictaluri* đột biến trên môi trường BHI – kanamicin (50 µg/ ml) và colistin (50 µg/ ml), ủ 28°C trong 72h.
- ❖ Kiểm tra kiểu gen của chủng *E. ictaluri* đột biến bằng phương pháp PCR

Các cặp mồi được thiết kế nhằm phân biệt các chủng *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* và *E. ictaluri* hoang dại 5H gồm các cặp mồi FUwzz/RDwzz, WF1/WR1 và FKm/RKm. Khuẩn lạc mọc trên môi trường BHI – kanamicin (50 µg/ ml) và colistin (50 µg/ ml) được đếm số lượng và lựa chọn ngẫu nhiên để ly trích ADN tổng số. Thực hiện phản ứng PCR kiểm tra các ADN khuẩn lạc này với lần lượt từng cặp mồi FUwzz/RDwzz, WF1/WR1 và FKm/RKm. Mỗi phản ứng gồm 0,5µl ADN khuẩn lạc ly trích, 0,2mM mồi mỗi loại 1 U *taq Dream*, 1 mM MgCl₂, 2,5 µl đệm 10x *Dream*, 0,2 mM dNTP, còn lại bổ sung nước vô trùng cho thể tích phản ứng là 25 µl. Phản ứng với cặp mồi FUwzz/RDwzz được thực hiện theo chương trình gia nhiệt gồm 95°C: 4 phút, 30 chu kỳ (95°C: 45 giây, 59°C: 1 phút, 72°C: 2 phút 30 giây), 72°C: 10 phút, sau đó giữ mẫu ở 4°C). Phản ứng với cặp mồi WF1/WR1 được thực hiện theo chương trình gia nhiệt gồm 95°C: 4 phút, 30 chu kỳ (95°C: 45 giây, 56°C: 1 phút, 72°C: 2 phút 15 giây), 72°C: 10 phút, sau đó giữ mẫu ở 4°C). Phản ứng với cặp mồi FKm/RKm được thực hiện theo chương trình gia nhiệt gồm 95°C: 4 phút, 30 chu kỳ (95°C: 45 giây, 60°C: 1 phút, 72°C: 1 phút 15 giây), 72°C: 10 phút, sau đó giữ mẫu ở 4°C). Theo lý thuyết, cặp mồi FUwzz/RDwzz cho sản phẩm PCR kích thước 2169 đối với chủng *E. ictaluri* đột biến và 1936 đối với chủng *E. ictaluri* hoang dại, cặp mồi WF1/WR1 không tạo sản phẩm PCR đối với chủng *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* và tạo sản phẩm PCR kích thước 1050 bp đối với chủng *E. ictaluri* hoang dại, cặp mồi FKm/RKm chỉ tạo sản phẩm PCR có kích thước 1325 bp đối với chủng *E. ictaluri* đột biến và không có sản phẩm đối với chủng hoang dại. Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra được thể hiện ở Hình 5.

Ví dụ 3: Loại bỏ gen kháng kanamicin ra khỏi bộ gen của vi khuẩn *E. ictaluri*.

Việc loại gen kháng kháng sinh khỏi chủng đột biến sử dụng kết hợp nhiều phương pháp theo các bước như sau:

- Nuôi các chủng *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* và dùng PCR để xác định chủng đột biến cần sử dụng.
- Nuôi *E.coli* DH5α để thu nhận và tách vector pCP20.

- Điện biến nạp vector pCP20 vào tế bào *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* khả nạp để loại gen kháng kháng sinh kanamicin.
- Loại pCP20 khỏi tế bào *E. ictaluri* bằng nhiệt.

Các bước sau khi hoàn thành cần được kiểm tra bằng phương pháp PCR và xem kết quả bằng phương pháp điện di.

❖ Chuẩn bị chủng đột biến *E. ictaluri* đột biến gen *wzz*:

Chủng *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* được cấy ria trên môi trường BHI có bổ sung kanamicin (50 µg/ ml) và colistin (50 µg/ ml), nuôi ở nhiệt độ 28 °C, trong 48-72h. Sau đó lấy một số khuẩn lạc đơn mọc riêng lẻ đem PCR với mồi FUwzz/RDwzz và FKm/RKm để khẳng định chủng cần sử dụng.

❖ Chuẩn bị vector pCP20:

Lấy chủng *E. coli* DH5α có chứa vector pCP20, cấy ria trên môi trường LB có bổ sung ampicillin, nuôi ở nhiệt độ 28°C trong 24h. Tiếp tục cấy khuẩn lạc đơn vào 5 ml LB có ampicillin, nuôi ở điều kiện nhiệt độ 28°C, lắc 250 vòng/phút trong 16h. Dịch nuôi cấy được tiến hành tinh sạch và thu nhận vector pCP20 theo protocol của bộ kit Miniprep (QIAGEN). Sản phẩm vector pCP20 tinh sạch có kích thước 9,4kb.

❖ Điện biến nạp vector pCP20 vào tế bào *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* khả nạp:

Chuẩn bị tế bào khả nạp *E. ictaluri* đột biến gen *wzz*

- Cấy 1 khuẩn lạc *E. ictaluri* vào 5 ml BHI lỏng, nuôi cấy qua đêm ở điều kiện lắc 250 vòng/phút ở 28 °C, trong 16h.
- Cấy chuyển tiếp 1 ml dịch nuôi cấy vào 100 ml BHI lỏng. Nuôi cấy lắc 18h điều kiện lắc 250 vòng/phút ở 28 °C.
- Chuyển dịch cấy vào các falcon 50 ml lạnh. Ngâm trong đá lạnh 10 phút.
- Ly tâm thu sinh khối ở 4000 vòng/phút trong 15 phút ở 2 °C, loại bỏ dịch nổi.
- Huyền phù sinh khối trong 50 ml nước lạnh, ly tâm 4000 vòng/phút trong 15 phút ở 2 °C, loại dịch nổi.
- Huyền phù sinh khối trong 50 ml glycerol lạnh 10%, ly tâm 4000 vòng/phút, 15ph, 2 °C, loại dịch nổi. Sau đó thực hiện bước này 1 lần nữa.
- Huyền phù sinh khối trong 2 ml glycerol lạnh 10%. Sau đó chia 100 ml dịch tế bào vào mỗi ống 1,5 ml.

Biến nạp vector pCP20 vào *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* khả nạp

- Trộn 100 ng vector pCP20 vào 100 ml tế bào *E. ictaluri* khả nạp, ủ trên đá 20 phút.

- Chuyển toàn bộ dịch tế bào vào cuvette lạnh.
- Đặt cuvette vào máy điện biến nạp, chỉnh máy ở mức 2500V, nhấn bắt đầu.
- Sau đó cho ngay 1 ml BHI vào cuvette, trộn đều và chuyển dịch tế bào sang 1 ống mới. Nuôi cấy lắc 100 vòng/phút, 28 °C, 45 phút.
- Trãi dịch tế bào trên BHI-ampicillin-colistin. Ủ ở 28 °C trong 48-72h.

Kiểm tra kiểu gen *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* sau biến nạp bằng PCR với môi chuyên biệt

- Sử dụng cặp môi FUwzz/RDwzz để tiến hành phản ứng PCR với khuẩn lạc *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* sau biến nạp. Thành phần phản ứng PCR gồm 0,5µl ADN khuẩn lạc ly trích, 0,2mM mỗi mỗi loại, 1 U *taq Dream*, 1 mM MgCl₂, 2,5 µl đệm 10x *Dream*, 0,2 mM dNTP, còn lại bổ sung nước vô trùng cho thể tích phản ứng là 25 µl. Chương trình gia nhiệt gồm 95°C: 4 phút, 30 chu kỳ (95°C: 45 giây, 59°C: 1 phút, 72°C: 2 phút 15 giây), 72°C: 10 phút, sau đó giữ mẫu ở 4°C).
- Theo lý thuyết, sản phẩm PCR có các kích thước như sau: 1936 bp (*E. ictaluri* hoang dại), 2169 bp (*E. ictaluri* đột biến gen *wzz* mang gen kháng kháng sinh Kanamicin) và 886 bp (476Uwzz + 384Dwzz + 26FRT = 886 bp, *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* đã loại bỏ gen kháng kháng sinh Kanamicin). Kết quả điện di sản phẩm PCR được thể hiện ở Hình 6.

❖ Loại bỏ pCP20

Vectơ pCP20 là loại vectơ nhạy cảm với nhiệt độ do vậy chúng ta có thể dùng phương pháp ủ nhiệt để loại pCP20.

- Cấy tăng sinh khuẩn lạc đơn *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* đã được biến nạp thành công vào 5 ml BHI-colistin, cấy lắc qua đêm ở nhiệt độ 28°C trong 16h, 250 vòng/phút.
- Từ dịch cấy tăng sinh, tiến hành loại pCP20 bằng cách ủ dịch nuôi cấy ở nhiệt độ 42°C trong 30phút.
- Sau đó pha loãng mẫu rồi trải trên môi trường BHI có bổ sung colistin, ủ ở nhiệt độ 28°C.

Ví dụ 4: Thử nghiệm độc lực chủng vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* (chủng WzLM) trên cá tra.

❖ Phương pháp ngâm

Cá giống 3 tháng tuổi, 20con/bể. Từ nồng độ dịch vi khuẩn 10⁹ CFU/ml ban đầu, pha loãng 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ trong NaCl 0,9% để đạt nồng độ 10⁷, 10⁶, 10⁵ CFU/ml. Cá được

tiến hành ngâm ở các nồng độ 10^5 , 10^6 , 10^7 CFU/ ml (đối với chủng WzLM, chủng AGUD, là chủng đột biến gen wzz được tạo ra từ nguồn chủng hoang dại được phân lập ở An Giang và chủng 5H, đồng thời là đối chứng (+)). Cá từ các bể được vớt ra xô và ngâm với lượng vi khuẩn tương ứng theo nghiệm thức trong thời gian 30 phút, nhiệt độ $24 - 26^\circ\text{C}$. Cá ở nghiệm thức đối chứng được ngâm trong nước. Khi đủ thời gian ngâm, cá được vớt ra khỏi xô và thả trở lại vào bể nuôi. Thí nghiệm được lập lại 3 lần. Sau 14 ngày quan sát, cá chết ở nghiệm thức ngâm chủng WzLM là 10% (10^5 CFU/ml), 37% (10^6 CFU/ml) và 95% (10^7 CFU/ ml). Tỷ lệ cá chết ở các lô đối chứng (+) lần lượt là 30% (10^5 CFU/ ml), 65% (10^6 CFU/ ml), 100% (10^7 CFU/ ml). Số liệu cá chết giữa các lô chủng WzLM và chủng 5H được thể hiện ở Bảng 3 và được đánh giá so sánh ở Biểu đồ 1 và Biểu đồ 2.

Bảng 3. Bảng tỷ lệ cá chết trong thử nghiệm đánh giá độc lực chủng WzLM bằng phương pháp ngâm

Nghiệm thức	WzLM 10^5 CFU/ ml	WzLM 10^6 CFU/ ml	WzLM 10^7 CFU/ ml	5H 10^5 CFU/ ml	5H 10^6 CFU/ ml	5H 10^7 CFU/ ml	ĐC (-)
Tỷ lệ chết (%)	10%	37%	95%	30%	65%	100%	0%

Căn cứ vào kết quả ngâm, tỷ lệ cá chết của chủng WzLM thấp hơn so với chủng hoang dại 5H khi ngâm cùng nồng độ (10^5 CFU/ ml - 10^7 CFU/ ml). Tuy nhiên, tỷ lệ chết của chủng đột biến WzLM còn rất cao. Vì vậy, hướng đề xuất tạo thêm đột biến gen *aroA* để tạo chủng có khả năng nhược độc.

Ngoài ra, liều gây chết 50% của chủng WzLM là $LD_{50} = 6 \times 10^6$ CFU/ml và của 5H trong thử nghiệm được xác định là $LD_{50} = 2,69 \times 10^5$ CFU/ml.

Ví dụ 5: Tạo dòng tế bào *E. coli* SM10 λ pir mang vector chứa gen *aroA* đột biến.

❖ Tạo dòng *E.coli* DH5 α mang vector chứa đoạn trước Cyki và đoạn sau Hypo của gen *aroA*

- Khuyếch đại hai đoạn 610 bp (Cyki) và 558 bp (Hypo) tương ứng với hai đoạn trước và sau của gen wzz với cặp mỗi đặc hiệu (Feyki: 5' - AA GAATTC AGTGTGCGGACGGTTTC - 3' và Rcyki: 5' - AA GGATCC GCCGCATTAGGATTTTATCTG - 3'; Fhypo: 5' - AA GGATCC GCTAAATCACTCCTGC - 3' và Rhypo: 5' - AA GTCGAC

TTTTTTATCAGAGTTTGGGATC - 3') từ 0,2µg ADN tổng số của chủng *E. ictaluri* 5H, 1 U *taq Dream*, 1 mM MgCl₂, 2,5 µl đệm 10x *Dream*, 0,2 mM dNTP, còn lại bổ sung nước vô trùng cho thể tích phản ứng là 25 µl. Phản ứng được thực hiện theo chương trình gia nhiệt gồm 95°C: 4 phút, 30 chu kỳ (95°C: 45 giây, 58°C: 1 phút, 72°C: 30 giây), 72°C: 10 phút, sau đó giữ mẫu ở 4°C). Kết quả điện di sản phẩm PCR được thể hiện ở Hình 7.

- Nối trực tiếp sản phẩm PCR hai đoạn Cyki và Hypo vào vector pJET1.2 đầu bằng bằng ADN T4 ligaza. Sản phẩm của phản ứng nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5α khả nạp. Các bước chuẩn bị tế bào *E. coli* DH5α khả nạp như trình bày ở phần tạo Uwzz và Dwzz của gen wzz. Phản ứng biến nạp phản ứng nối vào tế bào *E. coli* DH5α khả nạp được thực hiện như sau: trộn đều 10µl phản ứng nối vào 100 µl tế bào *E. coli* DH5α khả nạp, giữ trong bể đá 10 phút, chuyển nhanh dịch tế bào trên vào bể ổn nhiệt 42°C trong 2 phút, nhanh chóng chuyển dịch tế bào vào bể đá trong 1 – 2 phút, cho vào 250 µl môi trường LB, nuôi cấy lắc ở 37°C - 1 giờ, lấy 100 µl dịch nuôi cấy trải trên môi trường LB aga chứa ampicillin (50 µg/ ml), ủ 37°C. Sau 16h, thu được các dòng *E. coli* DH5α chứa vector pJET1.2 đầu bằng tái tổ hợp lần lượt mang đoạn Cyki và Hypo.

- ❖ Tạo dòng *E.coli* DH5α mang vector chứa đoạn gen kháng kháng sinh kanamicin
- ❖ Tạo dòng tế bào *E. coli* SM10 λ pir mang vector chứa trình tự Cyki – FRTK – Hypo (gen *aroA* đột biến)

Với mục đích tạo catxet gen *aroA* đột biến bao gồm đoạn trước Cyki, đoạn sau Hypo và gen kháng kháng sinh kanamicin FRTK, các vector pJET1.2 đầu bằng tái tổ hợp mang các trình tự tương ứng được thao tác theo thứ tự sau:

- Tạo vector pJET1.2 đầu bằng tái tổ hợp mang cả hai trình tự Cyki – Hypo: vector pJET1.2 đầu bằng tái tổ hợp mang riêng biệt trình tự Cyki và Hypo được cắt đồng thời bằng enzym giới hạn *Bam*HI và *Xba*I. Sản phẩm cắt được điện di trên gel agarosa 1% và tinh sạch đoạn vector pJET1.2 đầu bằng mang Cyki mở vòng và đoạn Hypo. Nối hai sản phẩm tinh sạch này với tỉ lệ 1/3 (vector chứa Cyki /đoạn Hypo) bằng enzym ADN T4 ligaza. Sản phẩm nối được biến nạp vào *E. coli* DH5α khả nạp với các bước tiến hành như đã mô tả ở trên. Sinh khối sau khi biến nạp được trải trên đĩa LB aga chứa ampicillin (50 µg/ ml), ủ 37°C. Sau 16h, thu được các dòng *E. coli* DH5α chứa vector pJET1.2 đầu bằng tái tổ hợp lần lượt mang cả hai trình tự Cyki – Hypo.
- Tạo vector pJET1.2 đầu bằng tái tổ hợp mang trình tự Cyki – FRTK – Hypo (gen *aroA* đột biến): vector pJET1.2 đầu bằng tái tổ hợp mang cả hai trình tự Cyki - Hypo và vectơ

pJET1.2 đầu bằng mang FRTK được cắt đồng thời bằng enzym giới hạn *Bam*HI. Sản phẩm cắt được điện di trên gel agarosa 1% và tinh sạch đoạn vector pJET1.2 đầu bằng mang Cyki - Hypo mở vòng và đoạn FRTK. Nối hai sản phẩm tinh sạch này với tỉ lệ 1/3 (vector chứa Cyki - Hypo/đoạn FRTK) bằng enzym ADN T4 ligaza. Sản phẩm nối được biến nạp vào *E. coli* DH5 α khả nạp với các bước tiến hành như đã mô tả ở trên. Sinh khối sau khi biến nạp được trải trên đĩa LB aga chứa ampicillin (50 μ g/ ml) và kanamicin (50 μ g/ ml), ủ 37°C. Sau 16h, thu được các dòng *E. coli* DH5 α chứa vector pJET1.2 đầu bằng tái tổ hợp mang catxet gen *aroA* đột biến. Sự hiện diện của catxet trong vector này được kiểm tra bằng phương pháp điện di phản ứng cắt vector với enzym cắt giới hạn *Eco*R I và *Sal*I ở Hình 8.

– Tạo vector pGP704 tái tổ hợp mang trình tự Cyki – FRTK – Hypo (catxet gen *aroA* đột biến): Để thực hiện tiếp hợp, gen đột biến cần được chuyển sang plamid có khả năng di động từ chủng cho sang chủng nhận. Ngoài ra, vector di động này cần phải có đặc tính chỉ tồn tại trong một loại tế bào nhất định nhờ vào một hệ thống mà tế bào chủng nhận như *E. ictaluri* không chứa yếu tố tương tự. Vector pGP704 có chứa gen kháng Ampicillin, không có điểm khởi đầu của sự sao chép (*oriE1*) nhưng mang điểm khởi đầu của sự sao chép R6K (*oriR6K*). Vector này thuộc loại vector tự hủy không nhân lên được trong tế bào bình thường mà đòi hỏi phải có protein Π mã hóa từ gen *pir*. Vì vậy, vector pJET1.2 đầu bằng mang catxet chứa gen *aroA* đột biến và vector pGP704 được cắt bằng enzym cắt giới hạn *Bg*III. Sản phẩm cắt được điện di trên gel agarosa 1% và vector pGP704 và đoạn catxet gen *wzz* đột biến được tinh sạch. Nối hai sản phẩm tinh sạch này với tỉ lệ 1/3 (vector pGP704/ catxet gen *aroA* đột biến) bằng enzym ADN T4 ligaza. Sản phẩm nối được biến nạp vào *E. coli* SM10 λ *pir* khả nạp với các bước tiến hành như đã mô tả đối với phương pháp biến nạp *E. coli* DH5 α . Sinh khối sau khi biến nạp được trải trên đĩa LB aga chứa ampicillin (50 μ g/ ml) và kanamicin (50 μ g/ ml), ủ 37°C. Sau 16h, thu được các dòng *E. coli* SM10 λ *pir* chứa vector pGP704 tái tổ hợp lần lượt mang catxet gen *aroA* đột biến. Sự hiện diện của catxet gen *aroA* đột biến trong vector pGP704 được khẳng định bằng phương pháp điện di phản ứng cắt vector với enzym cắt giới hạn *Bg*III ở Hình 9.

Ví dụ 6: Tiếp hợp *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* với *E. coli* SM10 λ *pir* mang vector chứa gen *aroA* đột biến.

Thực hiện tiếp hợp tương tự như đối với gen *wzz*

❖ Kiểm tra kiểu gen của chủng *E. ictaluri* đột biến bằng phương pháp PCR

Các cặp mồi được thiết kế nhằm phân biệt các chủng *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* và *aroA* và *E. ictaluri* hoang dại 5H gồm các cặp mồi Fcyki/Rhypo, FaroEI/RaroEI và FKm/RKm. Khuẩn lạc mọc trên môi trường BHI – kanamicin (50 µg/ ml) và colistin (50 µg/ ml) được đếm số lượng và lựa chọn ngẫu nhiên để ly trích ADN tổng số. Thực hiện phản ứng PCR kiểm tra các ADN khuẩn lạc này với lần lượt từng cặp mồi Fcyki/Rhypo, FaroEI/RaroEI và FKm/RKm. Mỗi phản ứng gồm 0,5µl ADN khuẩn lạc ly trích, 0,2mM mỗi mỗi loại 1 U *taq Dream*, 1 mM MgCl₂, 2,5 µl đệm 10x *Dream*, 0,2 mM dNTP, còn lại bổ sung nước vô trùng cho thể tích phản ứng là 25 µl. Phản ứng với cặp mồi Fcyki/Rhypo được thực hiện theo chương trình gia nhiệt gồm 95°C: 4 phút, 30 chu kỳ (95°C: 45 giây, 58°C: 1 phút, 72°C: 2 phút 30 giây), 72°C: 10 phút, sau đó giữ mẫu ở 4°C). Phản ứng với cặp mồi FaroEI/RaroEI được thực hiện theo chương trình gia nhiệt gồm 95°C: 4 phút, 30 chu kỳ (95°C: 45 giây, 51°C: 1 phút, 72°C: 2 phút 15 giây), 72°C: 10 phút, sau đó giữ mẫu ở 4°C). Phản ứng với cặp mồi FKm/RKm được thực hiện theo chương trình gia nhiệt gồm 95°C: 4 phút, 30 chu kỳ (95°C: 45 giây, 60°C: 1 phút, 72°C: 1 phút 15 giây), 72°C: 10 phút, sau đó giữ mẫu ở 4°C). Theo lý thuyết, cặp mồi Fcyki/Rhypo cho sản phẩm PCR kích thước 2493 với chủng *E. ictaluri* đột biến và 2455 với chủng *E. ictaluri* hoang dại, cặp mồi FaroEI/RaroEI không tạo sản phẩm PCR đối với chủng *E. ictaluri* đột biến và tạo sản phẩm PCR kích thước 1030 bp đối với chủng *E. ictaluri* hoang dại, cặp mồi FKm/RKm chỉ tạo sản phẩm PCR có kích thước 1325 bp đối với chủng *E. ictaluri* đột biến và không có sản phẩm đối với chủng hoang dại. Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra được thể hiện ở Hình 10.

Ví dụ 7: Loại bỏ gen kháng kanamicin ra khỏi bộ gen của vi khuẩn *E. ictaluri*.

Việc loại gen kháng kháng sinh khỏi chủng đột biến sử dụng kết hợp nhiều phương pháp theo các bước như sau:

- Nuôi các chủng *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* và *aroA*, dùng PCR để xác định chủng đột biến cần sử dụng.
- Nuôi *E.coli* DH5α để thu nhận và tách vector pCP20.
- Điện biến nạp vector pCP20 vào tế bào *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* và *aroA* khả năng để loại gen kháng kháng sinh kanamicin.
- Loại pCP20 khỏi tế bào *E. ictaluri* bằng nhiệt.

Các bước sau khi hoàn thành cần được kiểm tra bằng phương pháp PCR và xem kết quả bằng phương pháp điện di.

- ❖ Chuẩn bị chủng đột biến *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* và *aroA*:

Chủng *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* và *aroA* được cấy rìa trên môi trường BHI có bổ sung kanamicin (50 µg/ ml) và colistin (50 µg/ ml), nuôi ở nhiệt độ 28 °C, trong 48-72h. Sau đó lấy một số khuẩn lạc đơn mọc riêng lẻ đem PCR với môi FUwzz/RDwzz, Fcyki/Fhypo và FKm/RKm để khẳng định chủng cần sử dụng.

- ❖ Chuẩn bị vector pCP20: tương tự như mô tả trên

- ❖ Điện biến nạp vector pCP20 vào tế bào *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* và *aroA* khả nạp:

Chuẩn bị tế bào khả nạp *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* và *aroA*: tương tự các bước chuẩn bị tế bào khả nạp *E. ictaluri* đột biến gen *wzz*

Biến nạp vector pCP20 vào *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* và *aroA* khả nạp: tương tự các bước biến nạp vector pCP20 vào *E. ictaluri* đột biến gen *wzz*

Kiểm tra kiểu gen *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* và *aroA* sau biến nạp bằng PCR với môi chuyên biệt

- Sử dụng cặp môi FUwzz/RDwzz và Fcyki/Fhypo để tiến hành phản ứng PCR với khuẩn lạc *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* và *aroA* sau biến nạp. Thành phần phản ứng PCR gồm 0,5µl ADN khuẩn lạc ly trích, 0,2mM mỗi mỗi loại, 1 U *taq Dream*, 1 mM MgCl₂, 2,5 µl đệm 10x *Dream*, 0,2 mM dNTP, còn lại bổ sung nước vô trùng cho thể tích phản ứng là 25 µl. Chương trình gia nhiệt đôi với cặp môi Fcyki/Fhypo gồm 95°C: 4 phút, 30 chu kỳ (95°C: 45 giây, 58°C: 1 phút, 72°C: 2 phút 15 giây), 72°C: 10 phút, sau đó giữ mẫu ở 4°C).
- Theo lý thuyết, sản phẩm PCR với cặp môi FUwzz/RDwzz có các kích thước như sau: 1936 bp (*E. ictaluri* hoang dại), 2169 bp (*E. ictaluri* đột biến gen *wzz* mang gen kháng kháng sinh Kanamicin) và 886 bp (476Uwzz + 384Dwzz + 26FRT = 886 bp, *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* đã loại bỏ gen kháng kháng sinh Kanamicin), với cặp môi Fcyki/Fhypo có các kích thước như sau: 2455 bp (*E. ictaluri* hoang dại), 2493 bp (*E. ictaluri* đột biến gen *wzz* và *aroA* mang gen kháng kháng sinh Kanamicin) và 1194 bp (610Cyki + 558Hypo + 26FRT = 1194 bp, *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* và *aroA* đã loại bỏ gen kháng kháng sinh Kanamicin). Kết quả điện di sản phẩm PCR được thể hiện ở Hình 11.

- ❖ Loại bỏ pCP20

Vectơ pCP20 là loại vectơ nhạy cảm với nhiệt độ do vậy chúng ta có thể dùng phương pháp ủ nhiệt để loại pCP20. Thực hiện tương tự các bước loại bỏ pCP20 trên chủng *E. ictaluri* đột biến gen *wzz*.

Ví dụ 8: Thử nghiệm độc lực chủng vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* và *aroA* (chủng WzLM-AroM) trên cá tra.

Cá giống 3 tháng tuổi, 15con/bể. Từ nồng độ dịch vi khuẩn 10^9 CFU/ml ban đầu, pha loãng 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} trong NaCl 0,9% để đạt nồng độ 10^7 , 10^6 , 10^5 CFU/ml. Cá được tiến hành ngâm ở các nồng độ 10^5 , 10^6 , 10^7 CFU/ ml (đối với chủng WzLM-AroM và chủng 5H, đồng thời là đối chứng (+)). Cá từ các bể được vớt ra xô và ngâm với lượng vi khuẩn tương ứng theo nghiệm thức trong thời gian 30 phút, nhiệt độ $24 - 26^\circ\text{C}$. Cá ở nghiệm thức đối chứng được ngâm trong nước. Khi đủ thời gian ngâm, cá được vớt ra khỏi xô và thả trở lại vào bể nuôi. Thí nghiệm được lập lại 3 lần. Sau 14 ngày quan sát, cá chết ở nghiệm thức ngâm chủng WzLM-AroM là 0% ($10^5 - 10^7$ CFU/ ml). Tỷ lệ cá chết ở các lô đối chứng (+) lần lượt là 36% (10^5 CFU/ ml), 78% (10^6 CFU/ ml), 100% (10^7 CFU/ ml). Số liệu cá chết giữa các lô chủng WzLM và chủng 5H được thể hiện ở Bảng 4 và được đánh giá so sánh ở Biểu đồ 3 và Biểu đồ 4.

Bảng 4. Bảng tỷ lệ cá chết trong thử nghiệm đánh giá độc lực chủng WzLM-AroM bằng phương pháp ngâm

Nghiệm thức	WzLM-AroM 10^5 CFU/ ml	WzLM-AroM 10^6 CFU/ ml	WzLM-AroM 10^7 CFU/ ml	5H 10^5 CFU/ ml	5H 10^6 CFU/ ml	5H 10^7 CFU/ ml	ĐC (-)
Tỷ lệ chết (%)	0%	0%	0%	36%	78%	100%	0%

Dựa vào kết quả trên ta thấy, chủng đột biến WzLM-AroM hoàn toàn không gây chết cá và an toàn trên cá và liều gây chết 50% của chủng 5H là $\text{LD}_{50} = 4 \times 10^5$ CFU/ml. Vì vậy, trong các thử nghiệm tiếp theo chủng 5H sẽ được sử dụng ở nồng độ trên để công độc trong thử nghiệm hiệu quả bảo vệ.

Ví dụ 9: Thử nghiệm hiệu quả bảo vệ của vaccin chứa chủng vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* và *aroA* (vaccin WzLM-AroM) đối với bệnh gan thận mủ trên cá tra

Tiến hành thử nghiệm hiệu quả bảo vệ của vaccin WzLM-AroM trên cá giống 3 tháng tuổi bằng phương pháp ngâm một lần và ngâm kết hợp trên hai giai đoạn cá bột và cá giống

Thử nghiệm ngâm vaccin một lần trên cá giống

Cá được bố trí 15con/bể và ngâm với vaccin WzLM-AroM ở các nồng độ pha loãng 10^6 CFU/ ml, 10^7 CFU/ ml và nghiệm thức ngâm với vaccin WzM (chủng đột biến gen wzz được tạo ra từ nguồn là chủng hoang dại AG và được cấp bằng độc quyền sáng chế số 14407 cấp ngày 04/8/2015) ở nồng độ 10^7 CFU/ ml trong 30 phút, ở 26-28°C. Riêng nghiệm thức đối chứng (+) và (-) được ngâm trong nước ở thời gian và nhiệt độ tương tự. Thí nghiệm được lập lại 3 lần. Sau 14 ngày theo dõi. Cá các lô đã ngâm vaccin WzLM-AroM, WzM và lô đối chứng (+) được công độc bằng cách ngâm với chủng 5H ở nồng độ 10^6 CFU/ ml trong 30 phút, ở 26-28°C. Lô đối chứng (-) được ngâm trong nước. Cá được theo dõi tiếp trong 14 ngày và ghi nhận số lượng chết. Kết quả nhận được thể hiện trong Bảng 5, Biểu đồ 5 và biểu đồ 6.

Bảng 5. Bảng tỷ lệ cá chết và hiệu quả bảo vệ (RPS) trong thử nghiệm đánh giá hiệu quả bảo vệ của vaccin WzLM-AroM trên cá giống

Nghiệm thức	Vaccin WzLM-AroM Ngâm 10^6 CFU/ ml	Vaccin WzLM-AroM Ngâm 10^7 CFU/ ml	Vaccin WzM 10^7 CFU/ ml	ĐC (+)	ĐC (-)
Tỷ lệ chết (%)	71	33	51	91	0
RPS (%)	22	63	44	-	-

Dựa vào biểu đồ 5 và biểu đồ 6, nhóm thực hiện nhận thấy: cá ngâm vaccin WzLM-AroM nồng độ 10^7 CFU/ ml có tỷ lệ chết thấp hơn cá ngâm vaccin WzM cùng nồng độ. Đồng thời hiệu quả bảo vệ RPS của vaccin WzLM-AroM lần lượt là 22% (10^6 CFU/ml) và 63% (10^7 CFU/ml), trong khi hiệu quả bảo vệ RPS của vaccin WzM là 44% (10^7 CFU/ ml). Vậy, đánh giá sơ bộ vaccin WzLM-AroM có độc lực thấp, an toàn cho cá và có hiệu quả bảo vệ tương đối cao 63% (khi ngâm nồng độ 10^7 CFU/ ml trên cá giống 3 tháng tuổi).

❖ Thử nghiệm ngâm vaccin trên cá bột và cá giống

Hiệu quả bảo vệ của vacxin WzLM-AroM trên cá Tra giống được khảo sát bằng phương pháp ngâm lần 1 ở giai đoạn cá bột và ngâm lần 2 ở giai đoạn cá giống và sau đó cá được công độc với chủng hoang dại 5H (Bảng 6).

Bảng 6. Bố trí thí nghiệm hiệu quả bảo vệ của vacxin WzLM-AroM

Thí nghiệm	Mật độ vacxin WzLM-AroM (CFU/ml) dùng để ngâm cá Tra		Mật độ chủng hoang dại 5H (CFU/ml) dùng để công độc cá Tra giống
	Giai đoạn cá bột	Giai đoạn cá giống	
NT1	10^7	10^7	LD ₅₀
NT2	10^7	không ngâm	LD ₅₀
NT3	không ngâm	10^7	LD ₅₀
NT4	không ngâm	không ngâm	LD ₅₀
NT5	không ngâm	không ngâm	không ngâm

Phương pháp ngâm lần 1 trên cá bột

Cá bột sau khi nở khoảng 4 giờ vẫn còn noãn hoàn được vớt ra xô có sục khí, và được ngâm vacxin WzLM-AroM với nồng độ 10^7 CFU/ml trong thời gian 30 phút, nhiệt độ 24-26°C, mật độ cá 3000 con/bể. Sau thời gian ngâm, cá bột được thả trở lại bể composite 500 lít để nuôi theo dõi trong 21 ngày. Ghi nhận tỷ lệ sống của cá bột lên hương ở tất cả các thí nghiệm.

Phương pháp ngâm lần 2 trên cá giống

Cá hương được tiếp tục nuôi lên thành cá giống trong các bể composite 500 lít cho đến khi cá khoảng 3 tháng, cá được vớt vào bể composite 60 lít để thuần dưỡng trong vòng 1 tuần, tiến hành ngâm chủng đột biến lần WzLM-AroM lần 2 với mật độ 10^7 CFU/ml, trong thời gian 30 phút, nhiệt độ 24 – 26 °C. Mật độ cá thử nghiệm là 30 con/bể. Sau thời gian ngâm, cá giống được thả vào bể và nuôi theo dõi trong 14 ngày, ghi nhận số cá chết và các biểu hiện triệu chứng.

Công độc với chủng hoang dại 5H

Sau 21 ngày ngâm vacxin WzLM-AroM trên cá giống, tiến hành công độc ở với chủng hoang dại 5H (bảng 6). Cá giống được vớt ra xô và ngâm với chủng hoang dại ở nồng độ LD₅₀, trong thời gian 30 phút, nhiệt độ 24 – 26 °C. Sau thời gian ngâm, vớt cá trở lại bể và tiến hành theo dõi trong 14 ngày, ghi nhận số cá chết, các biểu hiện triệu chứng và xác định hiệu quả bảo vệ thông qua hệ số tỷ lệ sống tương đối RPS (Relative percentage survival) của Amend (1981) theo công thức:

$RPS (\%) = [1 - \text{tỷ lệ cá chết do chủng thử nghiệm} / \text{tỷ lệ cá chết ở nghiệm thức đối chứng (+)}] \times 100$.

Kết quả nhận được thể hiện trong Bảng 7, Biểu đồ 7 và Biểu đồ 8.

Bảng 7. Tỷ lệ cá chết và hiệu quả bảo vệ (RPS) trong thử nghiệm đánh giá hiệu quả bảo vệ của vaccin WzLM-AroM trên cá giống

Nghiệm thức	Loại cá	Tỷ lệ chết (%) của cá giống	RPS (%)
NT1	Cá giống có xử lý vaccin cá bột, cá giống và công độc	6,67	87
NT2	Cá giống có xử lý vaccin cá bột và công độc	21,67	59
NT3	Cá giống có xử lý vaccin cá giống và công độc	18,33	65,6
NT4	Cá giống không xử lý vaccin và công độc	53,33	-
NT5	Cá giống không xử lý vaccin và không công độc	0	-

Vaccin WzLM-AroM khi ngâm với cá ở cả hai giai đoạn cá bột và cá giống (NT1) cho hiệu quả bảo vệ cao nhất với RPS là 87%, trong khi chỉ ngâm ở giai đoạn cá bột (NT2) và cá giống (NT3) thì hiệu quả bảo vệ đạt được thấp hơn với RPS lần lượt là 59%, 65,6%

Kết quả này cho thấy vaccin WzLM-AroM đều cho hiệu quả bảo vệ cá giống trước sự xâm nhiễm của chủng *E. ictaluri* hoang dại kể cả khi ngâm cá ở từng giai đoạn phát triển của cá (cá bột hoặc cá giống) hay cả hai giai đoạn.

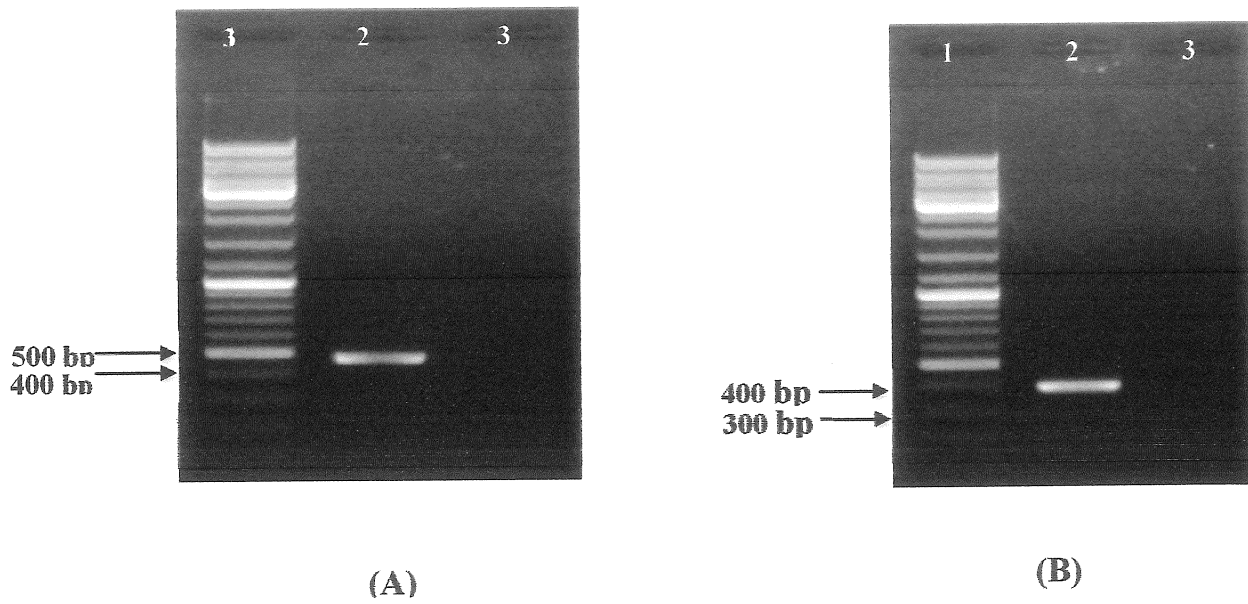
Hiệu quả có thể đạt được của giải pháp hữu ích

Chủng *E.ictaluri* đột biến gen *wzz* và *aroA* (chủng WzLM-AroM) theo giải pháp hữu ích và vaccin chứa chủng vi khuẩn này (vaccin WzLM-AroM) có thể sử dụng để làm giảm tác hại của bệnh gan thận mũ xuống mức thấp nhất có thể. Chủng WzLM-AroM được sử dụng làm vaccin ở nồng độ gốc 10^9 CFU/ ml, nồng độ sử dụng 10^7 CFU/ ml. Hệ số bảo vệ bằng phương pháp ngâm đạt 60% ngay trong lần ngâm đầu tiên. Vì vậy, chủng vi khuẩn *E.ictaluri* đột biến gen *wzz* và *aroA* được sử dụng làm vaccin nhược độc phòng bệnh gan thận mũ cho cá tra.

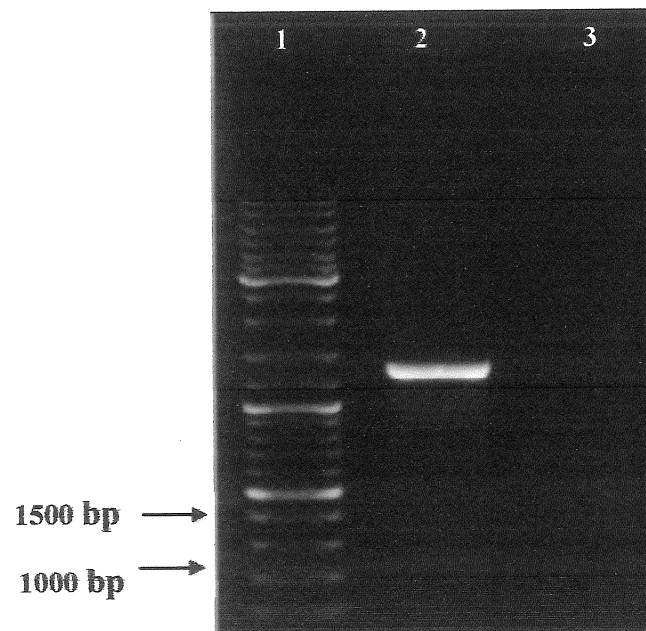
Yêu cầu bảo hộ

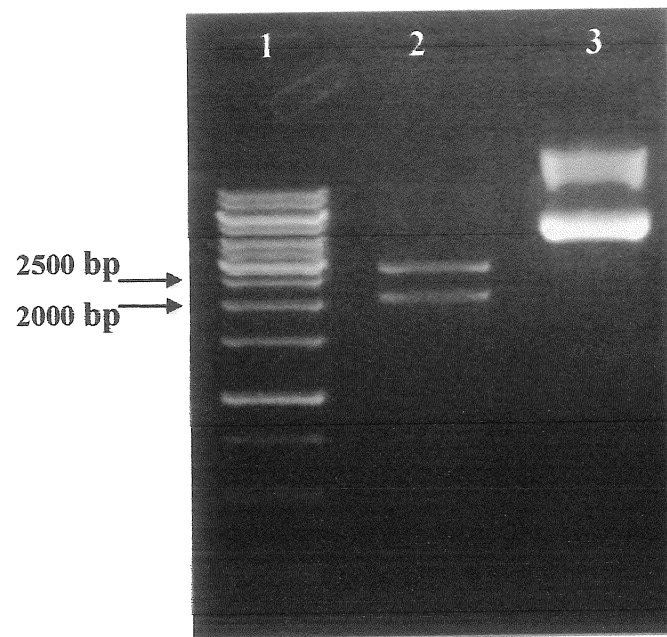
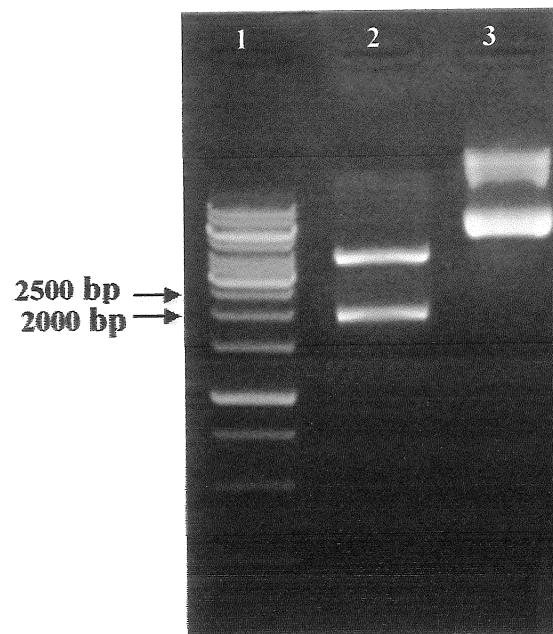
1. Chủng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* mang gen đột biến *wzz* và *aroA* lần lượt có trình tự nêu trong SEQ ID No:1 và SEQ ID No:6.
2. Vacxin phòng bệnh gan thận mũ cho cá tra chứa chủng vi khuẩn theo điểm 1 được hòa tan trong dung dịch NaCl 0,9% ở nồng độ 10^9 CFU/ml.

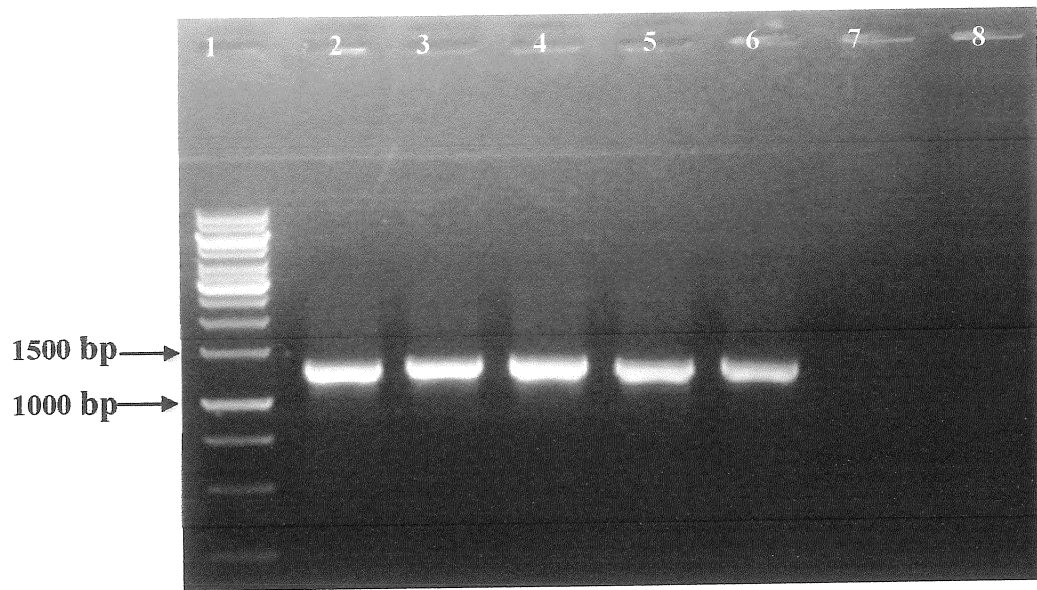
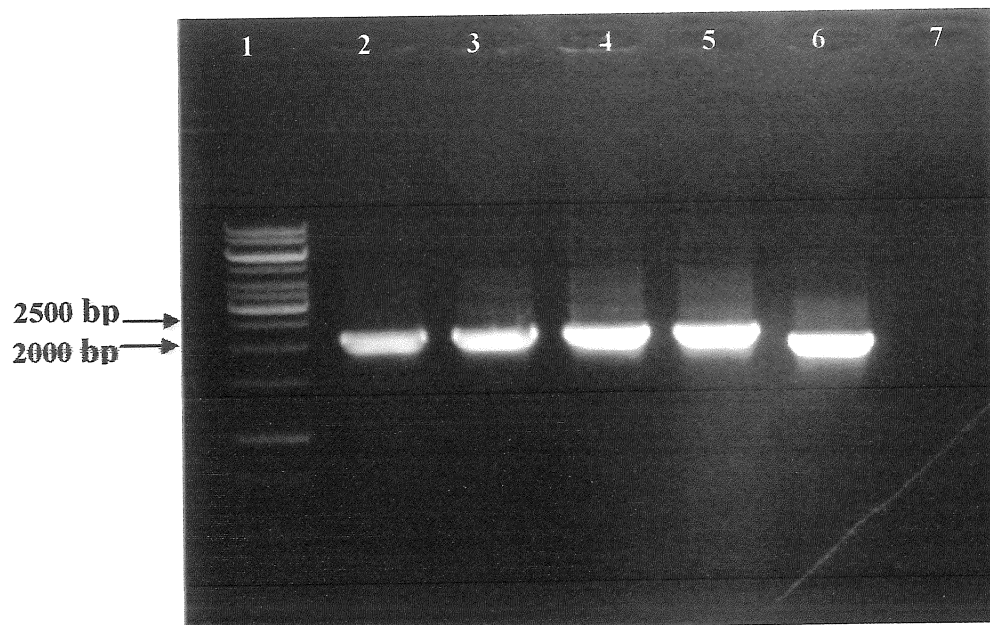
Hình 1

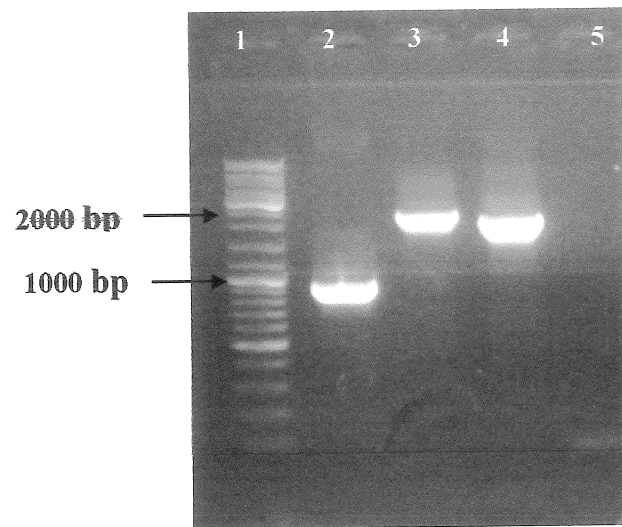


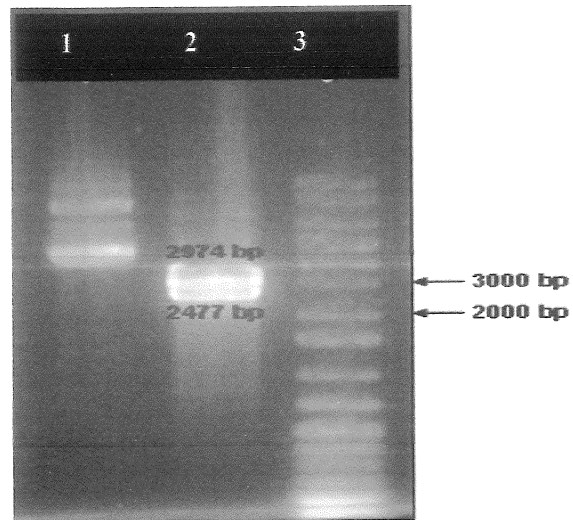
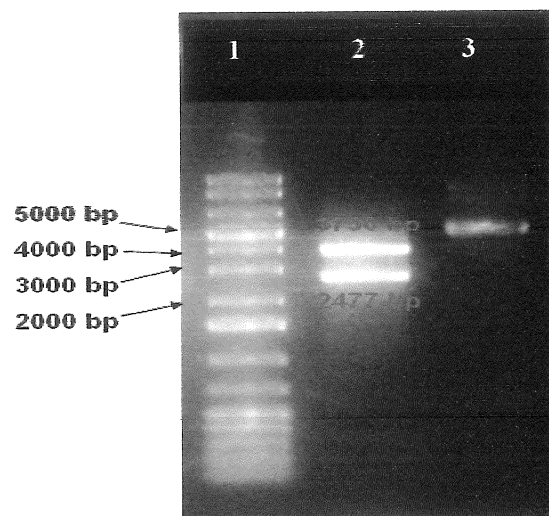
Hình 2



Hình 3**Hình 4**

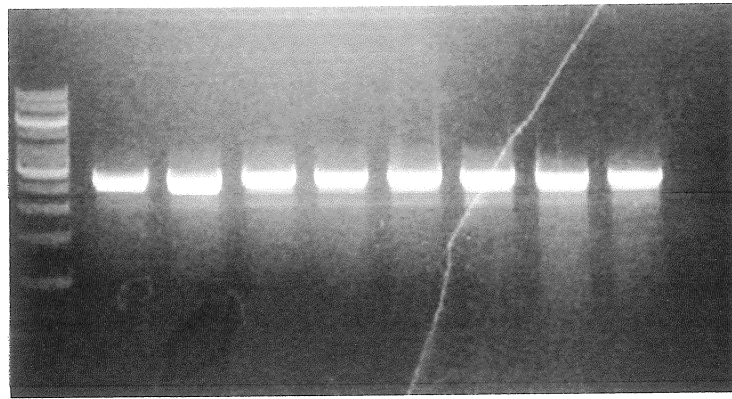
Hình 5**(A)****(B)**

Hình 6**Hình 7**

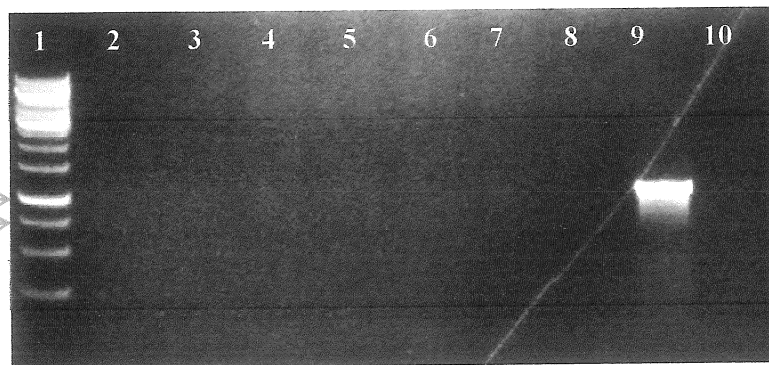
Hình 8**Hình 9**

Hình 10

3000 bp →
2500 bp →

**(A)**

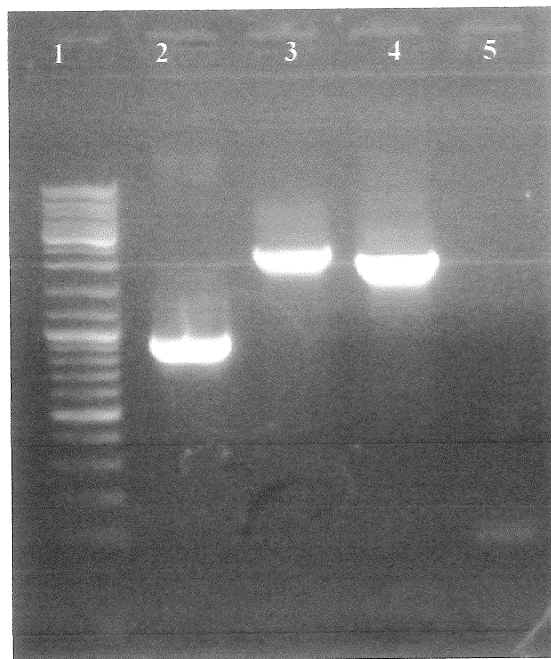
1000 bp →
750 bp →

**(B)**

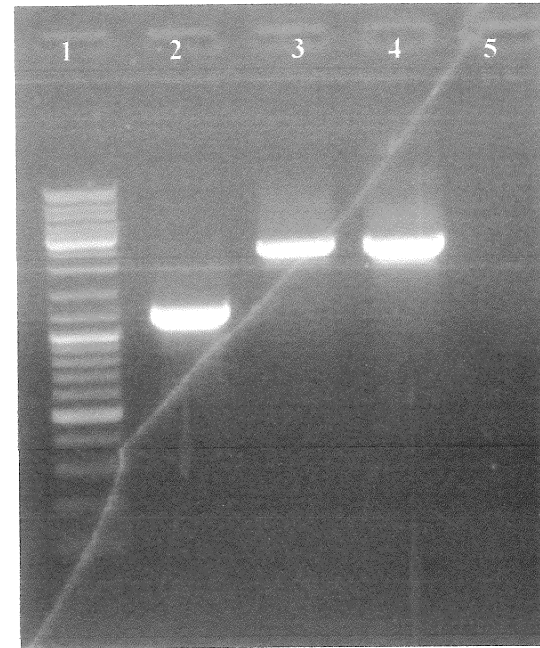
1500 bp →
1000 bp →

**(C)**

Hình 11

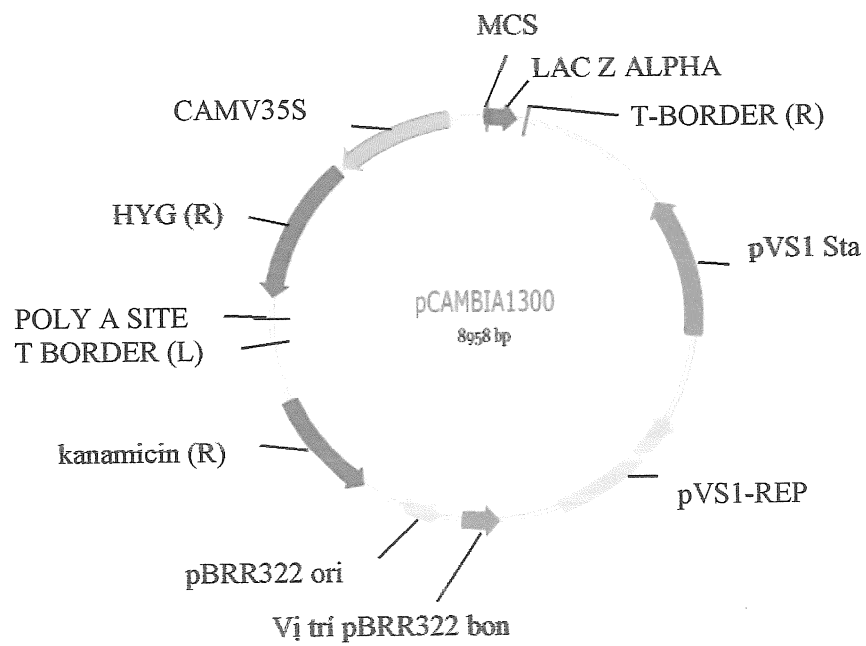


(A)

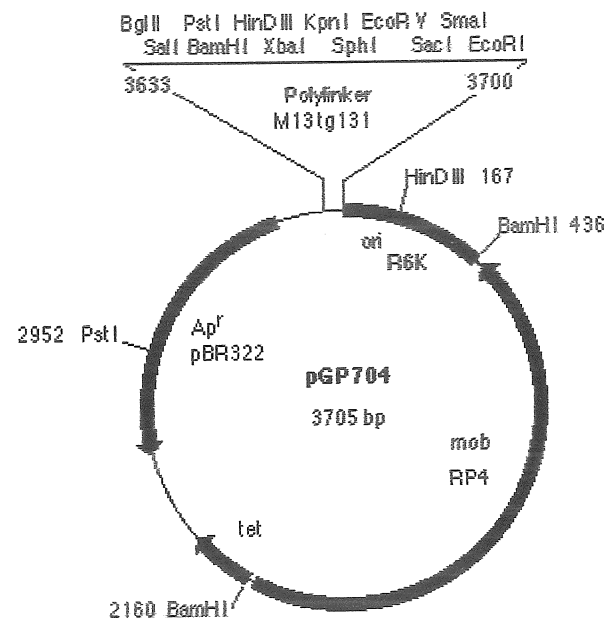


(B)

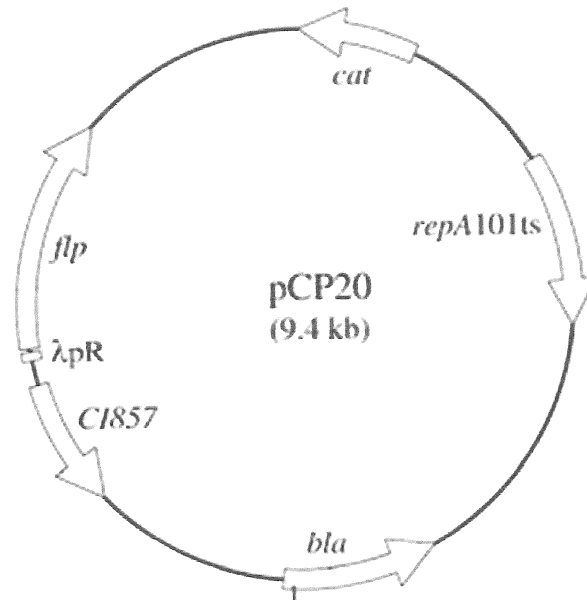
Hình 12.



Hình 13

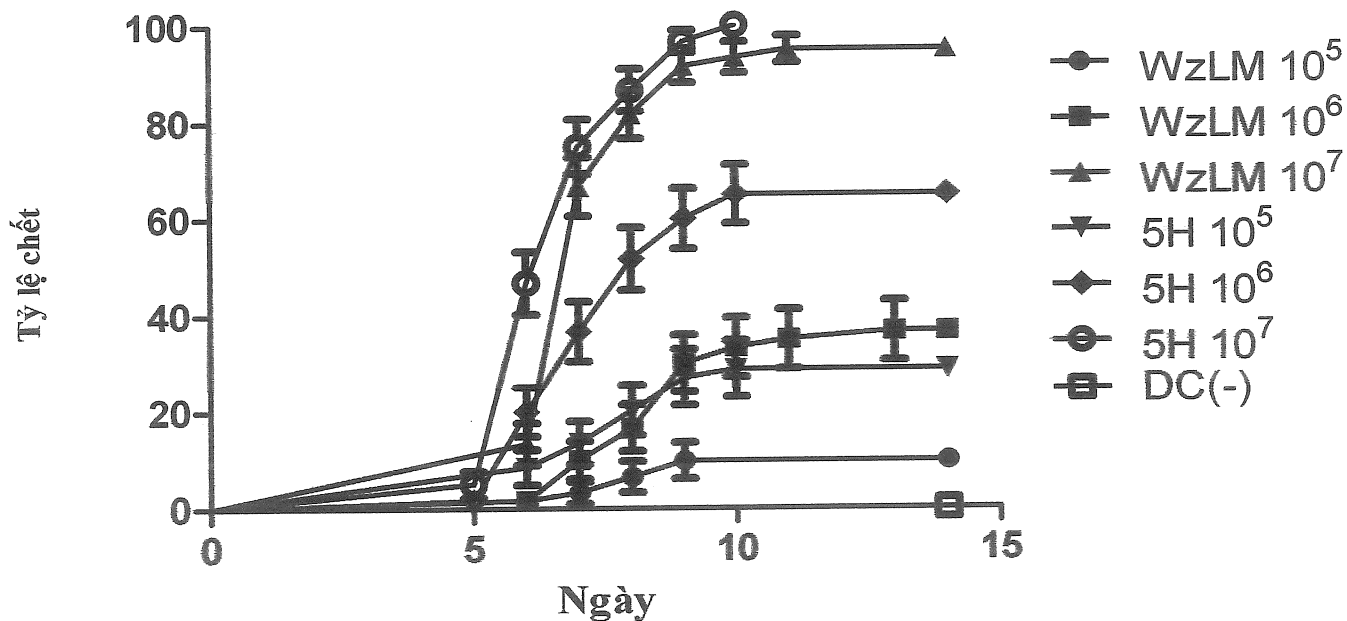


Hình 14

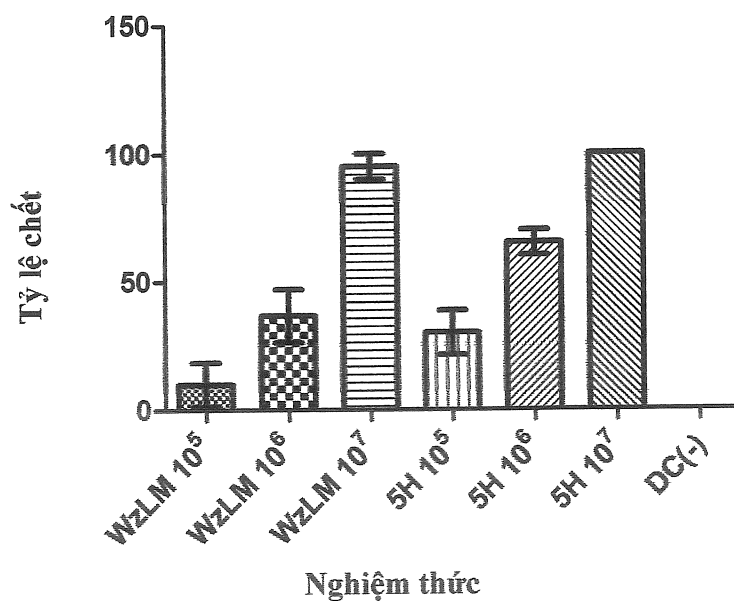


Hình 15

Biểu đồ 1. Tỷ lệ cá chết tích lũy theo ngày của thử nghiệm đánh giá độc lực chủng WzLM bằng phương pháp ngâm

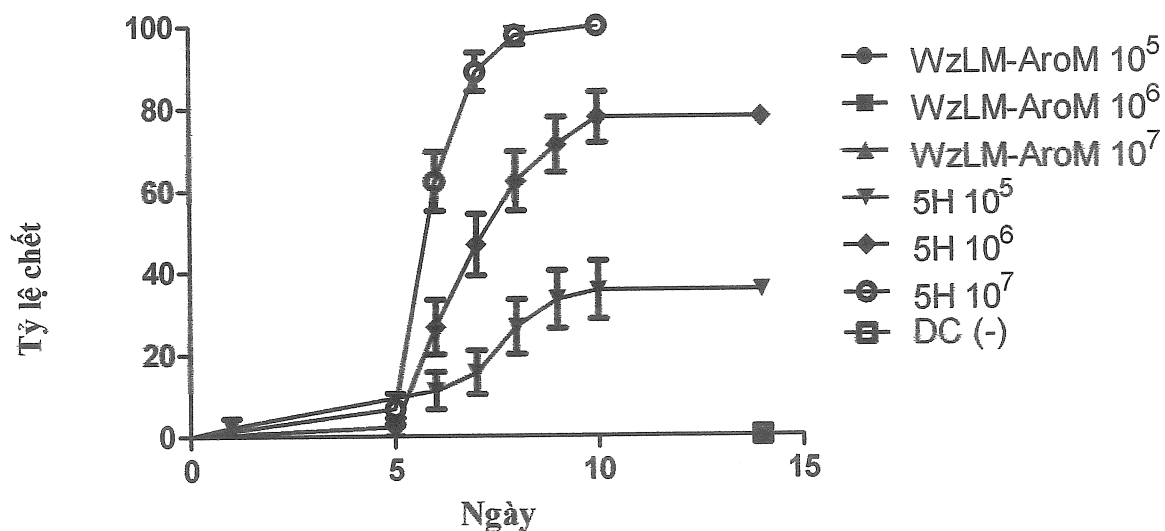
**Hình 16**

Biểu đồ 2. Tỷ lệ cá chết trung bình của thử nghiệm đánh giá độc lực chủng WzLM bằng phương pháp ngâm

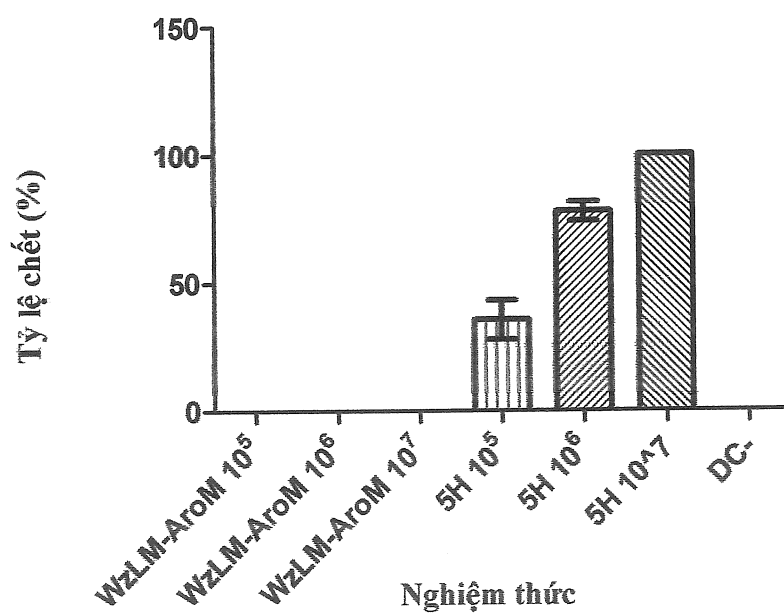


Hình 17

Biểu đồ 3. Tỷ lệ cá chết tích lũy theo ngày của thử nghiệm đánh giá độc lực chủng WzLM-AroM bằng phương pháp ngâm

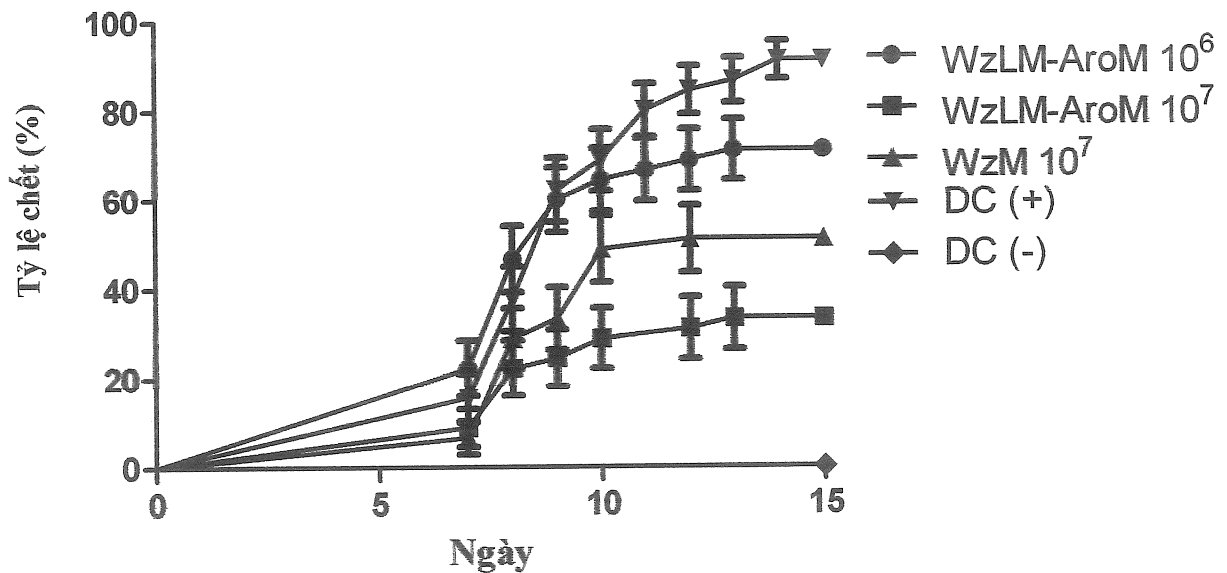
**Hình 18**

Biểu đồ 4. Tỷ lệ cá chết trung bình của thử nghiệm đánh giá độc lực chủng WzLM-AroM bằng phương pháp ngâm

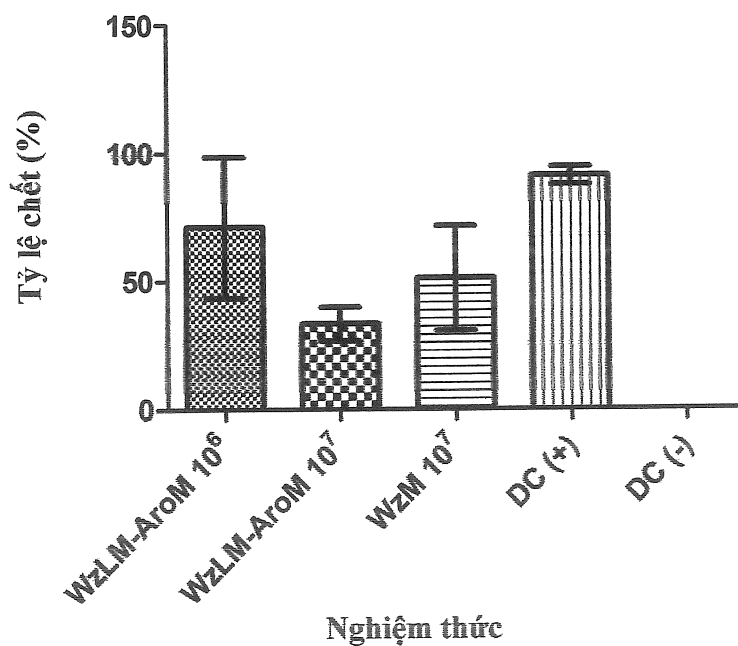


Hình 19

Biểu đồ 5. Tỷ lệ cá chết tích lũy theo ngày của thử nghiệm đánh giá hiệu quả bảo vệ chủng WzLM-AroM bằng phương pháp ngâm một lần trên cá giống

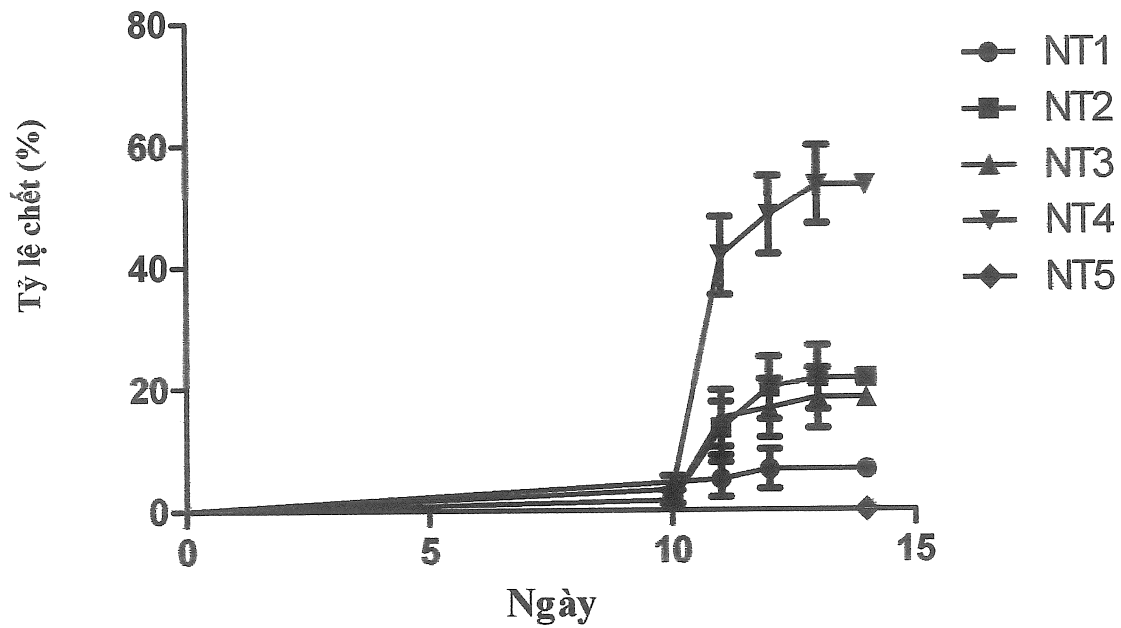
**Hình 20**

Biểu đồ 6. Tỷ lệ cá chết trung bình của thử nghiệm đánh giá hiệu quả bảo vệ chủng WzLM-AroM bằng phương pháp ngâm một lần trên cá giống

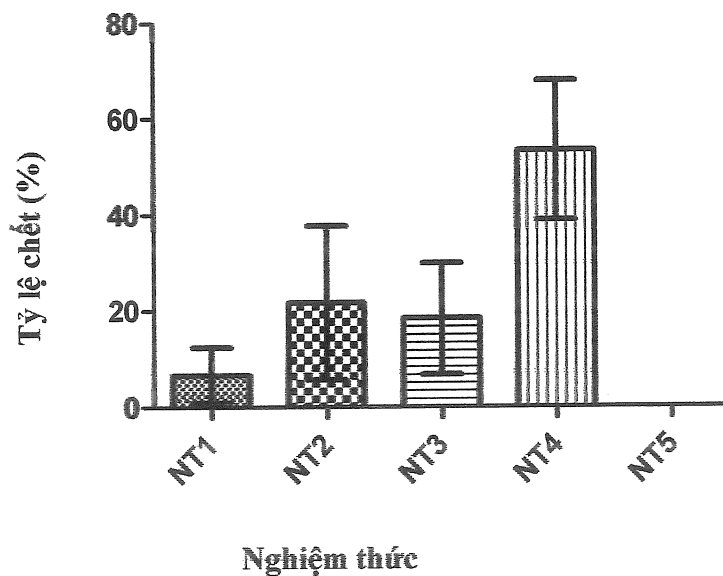


Hình 21

Biểu đồ 7. Tỷ lệ cá chết tích lũy theo ngày của thử nghiệm đánh giá hiệu quả bảo vệ chủng WzLM-AroM bằng phương pháp ngâm kết hợp trên cá bột, cá giống

**Hình 22**

Biểu đồ 8. Tỷ lệ cá chết trung bình của thử nghiệm đánh giá hiệu quả bảo vệ chủng WzLM-AroM bằng phương pháp ngâm kết hợp trên cá bột, cá giống



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> TRUNG TÂM CÔNG NGHỆ SINH HỌC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

<120> Chủng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* đột biến gen wzz và aroA và vacxin chứa chủng vi khuẩn này

<160> 8

<210> 1

<211> 1038

<212> ADN

<213> *Edwardsiella ictaluri*

<400> 1

```

1  atggtgagtc aaaatccgat gcccgtaggag aatgagctgg atgtccgggg gctgtgtcgt
61  gcgctgtggc acggttaagcc ctgggtcggtt ggcacggcag cgctgtttgc ggcgctggcg
121 ctggggcgtct ctctgctgat gccgcagaaa tggagcgcg cggcgatcac tgcgagcccg
181 ggcgttaacc gtctgggtag ctactactcc cagcagcagt ttttacgcaa tcttgcgtag
241 ctgagtgcgc ccagcggcgc ggcggcgcag ggcagcatcg ctgatgaggc gtatgccgag
301 ttcacgacac agctggcctc ctatgacacg cggcgcgagt tttggctgcg tagcccctat
361 tatcagcgtc ataaagaggg gagtgcacag gcgatgcgg cgctgctgga tgagctgatt
421 aatcagatcg tctttacgcc gggggaggcg acgaagcaca gcgatgacag cattcgctt
481 accgccgacg gcgccgcgca ggctaaccag ctgctgcgcc agtacgttgc ctttgccgcc
541 catcgtgcca gcgccaatct gaatgcgtct ctgcaggggg cctggggcggc ccgcagcacc
601 tttctgaagg cgcaggtaaa acgtcaggag gcggtggcac aggcgatcta tcagcgtgag
661 ttaaacggcc tggagcaggg gctgaagatt gccgcgcagc aggggattac ccgcagcatg
721 gcaacgacgg cgcaggccga cttgccctat gccgagctgt ttatgctggg acagccgatg
781 ctgcgcgcgc gtctggaggc actgcgcgcc gttggggccat cctatgacat tgactatgac
841 cggaatcggg cgatgctcac gaccctgagc gtcggggccg ttttggacgc ggcgtttcag
901 ccctatcgct atctgcgtac gccggaggag ccggtgaagc gcgatagtcc gcgccgactc
961 tttatgatgg taatgtgggg cgccattggt gcgctgcttg gcgccggtat tgcactttcc
1021 cgtcgtgcac ggatctga

```

<210> 2

<211> 460

<212> ADN

<213> *Edwardsiella ictaluri*

<400> 2

1 gtaccctgat cggctttacc gttatctgga ttttgctgga gagcaccag gggcgcgggc
 61 atccgatgaa cccggtgacg gcgctgtggg ttatcgcgat accgctgatg gatatgatcg
 121 ccattatgta tcggcgctg cgcaaaggga tgagtcctt ttctccagat cgccagcata
 181 ttcattcacct gattatgcgc gctggtttta cctcccgcca ggcgtttgtc ctgattacgc
 241 tggcggcggg gttgctggcg gcgattgggg ttctgggtga gatctggctg cctgaatatg
 301 ccatgatggc actgttcttg cttgcttttg ccctctatgg ttactgtatc aagcgcgcg
 361 ggcgcgtggc gcgtatggtg aagcgcttta agcgccgct gcgtcgtaaa tcgacaggca
 421 tacatgtcta acggccctag tcggccataa agggaaaacc

<210> 3

<211> 368

<212> ADN

<213> *Edwardsiella ictaluri*

<400> 3

1 ggatcggcgg taacaaaaga agaatgatac agtgaaagtg ttaaccgtct ttggcacgcg
 61 tcctgaagcg atcaaaatgg ccccttgggt gcatgcgctg gccgccgacg ccgcgtttga
 121 tgcccgcgtc tgcgtcaccg ccagcaccg ggagatgttg gatcagggtgc tggggctgtt
 181 tcaaattcgag ccgattacg atctgaacat tatgcgtccg ggacaggatc tgagcgatat
 241 tacctgccgg attctggagg ggtcaagcc catcctggcc gagttccgac ccgacgtagt
 301 gctgggtcac ggcgatacca ccaccacgct ggcgggccagc ctggcgggcat tttaccagcg
 361 aattccggt

<210> 4

<211> 1219

<212> ADN

<213> Vector pCAMBIA 1300

<400> 4

1 ctaaaacaat tcatccagta aatatataata ttttattttc tccaatcag gcttgatccc
 61 cagtaagtca aaaaatagct cgacatactg ttcttccccg atatcctccc tgatcgaccg
 121 gacgcagaag gcaatgtcat accacttgct cgccctgccg cttctcccaa gatcaataaa
 181 gccacttact ttgccatctt tcacaaagat gttgctgtct ccagggtcgc cgtgggaaaa
 241 gacaagttcc tcttcgggct tttccgtott taaaaaatca tacagctcgc gcggatcttt
 301 aaatggagtg tcttcttccc agttttcgca atccacatcg gccagatcgt tattcagtaa

361 gtaatccaat tcggctaagc ggctgtctaa gctattcgta tagggacaat ccgatatgtc
 421 gatggagtga aagagcctga tgcactccgc atacagctcg ataattctttt cagggtcttg
 481 ttcattcttca tactcttccg agcaaaggac gccatcggcc tcaactcatga gcagattgct
 541 ccagccatca tgccgttcaa agtgcaggac ctttgggaaca ggcagctttc cttccagcca
 601 tagcatcatg tccttttccc gttccacatc ataggtggtc cctttatacc ggctgtccgt
 661 cattttttaa tataggtttt cattttctcc caccagctta tataccttag caggagacat
 721 tccttccgta tcttttacgc agcgggtattt ttccgatcagt tttttcaatt ccggtgatat
 781 tctcatttta gccatttatt atttccttcc tcttttctac agtattttaa gataccccaa
 841 gaagctaatt ataacaagac gaactccaat tcaactgttc ttgcattcta aaaccttaaa
 901 taccagaaaa cagctttttc aaagttgttt tcaaagttgg cgtataacat agtatcgacg
 961 gagccgattt tgaaaccgcg gtgatcacag gcagcaacgc tctgtcatcg ttacaatcaa
 1021 catgctaccc tccgcgagat catccgtgtt tcaaaccggg cagcttagtt gccgttcttc
 1081 cgaatagcat cggtaacatg agcaaagtct gccgccttac aacggctctc ccgctgacgc
 1141 cgtcccggac tgatgggctg cctgtatcga gtggtgattt tgtgccgagc tgccggctcg
 1201 ggagctgttg gctggctgg

<210> 5

<211> 1325

<212> ADN

<213> *Escherichia coli* DH5 α

<400> 5

1 ggatccagtt cctattccga agttcctatt ctctagaaag tataggaact tcctaaaaca
 61 attcatccag taaaatataa tattttattt tctcccaatc aggcttgatc cccagtaagt
 121 caaaaaatag ctgcacatac tgttcttccc cgatatctc cctgatcgac cggacgcaga
 181 aggcaatgtc ataccacttg tccgccctgc cgcttctccc aagatcaata aagccactta
 241 ctttgccatc tttcaciaag atgttgctgt ctcccaggtc gccgtgggaa aagacaagtt
 301 cctcttcggg cttttccgtc tttaaaaaat catacagctc gcgcggatct ttaaattggag
 361 tgtcttcttc ccagttttcg caatccacat cggccagatc gttattcagt aagtaatcca
 421 attcggctaa gcggctgtct aagctattcg tatagggaca atccgatatg tcgatggagt
 481 gaaagagcct gatgcactcc gcatacagct cgataatctt ttcagggtt tgttcatctt
 541 catactcttc cgagcaaagg acgccatcgg cctcactcat gagcagattg ctccagccat
 601 catgccgttc aaagtgcagg acctttggaa caggcagctt tccttccagc catagcatca
 661 tgtccttttc ccgttccaca tcataggtgg tccctttata ccggctgtcc gtcattttta
 721 aatatagggtt ttcattttct cccaccagct tatatacctt agcaggagac attccttccg
 781 tatcttttac gcagcgggtat ttttcgatca gttttttcaa ttccgggtgat attctcattt
 841 gaagctaatt ataacaagac gaactccaat tcaactgttc ttgcattcta aaaccttaaa
 901 ttataacaag acgaactcca attcactgtt ccttgcattc taaaacctta aataccagaa

961 aacagctttt tcaaagttgt tttcaaagtt ggcgtataac atagtatcga cggagccgat
 1021 tttgaaaccg cggatgatcac aggcagcaac gctctgtcat cggtacaatc aacatgctac
 1081 cctccgcgag atcatccgtg tttcaaaccg ggcagcttag ttgccgttct tccgaatagc
 1141 atcgggtaaca tgagcaaagt ctgccgcctt acaacggctc tcccgcgtgac gccgtcccgg
 1201 actgatgggc tgccgtgtatc gagtggtgat tttgtgccga gctgccggtc ggggagctgt
 1261 tggctggctg ggaagttcct attccgaagt tcctattctc tagaaagtat aggaacttcg
 1321 gatcc

<210> 6

<211> 1287

<212> ADN

<213> *Edwardsiella ictaluri*

<400> 6

1 gtgacagcgt tcaacaaaaa cggtagaaaa atacccttaa caggaagcgc ggccatgatg
 61 gcagcgcgtgt ttgccagca ggagtgattt agcatgtcgt ccgccctgac gttacaaccc
 121 gtgcgcgcgt ttagcggcga gattaatctg cccggctcga aaagcgtttc caaccgcgcc
 181 ctgctcctgg cagcgcaggc ccgcggcgta acgcggctgc ataacctgct cgacagcgac
 241 gatgtgcgct acatgctcga tgcccttaag gcgctgggcg tgcgctatca gctgtcggac
 301 tgccgcaccc gctgcgaggt gcagggactc ggggggacgc tgagcgccca cggcgcgctg
 361 acgctgtttc tgggcaatgc cggcacggcg atgcgccgc tggcggcggc gctcagcctg
 421 gggctacgcg atgtgatcct gaccggggag ccgcgcgatga aggagcgtcc gatcgcgcgt
 481 ctggtgaccg ccctgcgtca gggcgggtgcg caggttgact atctggagag cgatggctat
 541 ccgcccgtag gtctgcacgg cggttttaac ggcggagaga tcagcgttga cggctcggtc
 601 tccagccagt ttctgaccgc gctgctgatg gcggcgccga tggcggcaga ggagaccgct
 661 atcaccattc tgggagagct ggtttccaag ccctatatcg ccattacgct ggcgatgatg
 721 cgggcgttcg gcgtggaggt ggagaatcac gcgtatcgcc atttcgtggt gcgggggggg
 781 caggtctatc aggctccgag cgactatctg gtcgaaggag atgcatcctc ggcgtcgtac
 841 tttctggccg gcgcagcgat ccgcggcggt accgtccggg tgaccggaat tgggcgccac
 901 agcatgcagg gggatattca ctttgccgat gtgctggaaa aaatgggggc gcaggtcgaa
 961 tgggggaatg actatatcgc ctgcaccgag gatagcctgc acggcatcga tatggatatg
 1021 aatgcgatcc ccgatgcggc gatgaccatc gccaccaccg cgctgtttgc caaagggccg
 1081 acgactctgc gcaatattta caattggcgt gtcaaggaga ccgatgcctt ggcggcaatg
 1141 gccagtgagc tgcgtaaggt ggggtgctgtg gtcgaggagg ggacggactt tctgcgcatt
 1201 gagccgcccg cgcagctgca ggcggcgagc attgccacct acaacgatca ccgcatggcc
 1261 atgtgttttt cactggtggc gttgtcgggc acgccggtga ccattctgtga ccccggttgt
 1321 accgcaaaaa cctttccgga ttactttcgc cagttctccg cgctgtgccca tccgcgctaa

1381 gccgcattag gatttttatct gtaaagccgg cgtagacgta cgccggcctt

<210> 7

<211> 602

<212> ADN

<213> Edwardsiella ictaluri

<400> 7

1 agtgttgccg acggtttccg tgcggatcgc cgtactgaca tcctcccctt ccaggatcac
61 ccgcagatcg ccctcggcgg cgtcaaagcg cacatccagg tgcgccgcca gcggaaccaa
121 cgcctcttct gaatcgatat taacctgatg gtgcagcgcg gccagcgcca gcacgcggta
181 aatcgcaccg gagtcgagta aatgccagcc aagggcctgt gccagcgctt tgcacagcgt
241 tcctttacct gcgccgctgg gcccatctac ggtaatgacc gggactatcg ccgtcattgt
301 tgtctcctct ctattggaac ctccgaccct gtggatcgga aaaacatggt ggggaatagc
361 ggcctcgctg gaccgcgcgc attccccaac acgctcagcg acaggcgtgg aatacgccgg
421 tattatacgc tgtcaccggg cgaactgtta cccttgaagg tgagggttgc gggaaaactg
481 acggcgaaaag ccgcagagcg gacgaacccc aaacgattgc ctgcactgca gggcgggtgca
541 atcggatagc aaaaagccgg cgtacgtcta cgccggcctt acagataaaa tcctaattgcg
601 gc

<210> 8

<211> 550

<212> ADN

<213> Edwardsiella ictaluri

<400> 8

1 gctaaatcac tcctgctggg caaacagcgc tgccatcatg gccgcgcttc ctgttaaggg
61 tattttttgta ccgtttttgt tgaacgctgt cactatgcga cgccccacca gcgccttctc
121 tacagagata ccaataaatc tatgcccccc atttttatat caccaccacg gctgatgccc
181 gccaacgtcg atttaccgcc cgtgccgtat tgctggggaa caactccagt ggaagcagca
241 aaatgcctgc tgtatgaaaa ttgtttgccg tcgccgggct ggggcgagag caggcggggc
301 gtaatcaaac caacaccggg tattatcatg atgcgttgaa tggcatcatc agctttgatt
361 gactgggttta attctgactc cagcgttggt attggctcaa caaggcaagg caaagtaaag
421 agagtgagta tgcaacttca ccagcagacg gttacgggtat ccggggagtc catattcggc
481 cagaaccaga gacagccggt ttattactgc atcaccgatg ggcagactga tcccaaactc
541 tgataaaaaa