

Nghiên cứu giải pháp chuyển cấu trúc gen ức chế quorum-sensing vào vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

Nguyễn Thị Thu Thủy, Nguyễn Thị Thu Huyền, Phạm Thế Hải*

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN,
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 20 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: Nuôi trồng thủy sản ở Việt Nam đã và đang phát triển mạnh trong những năm gần đây và trở thành ngành kinh tế quan trọng đối với nền kinh tế chung của đất nước. Tuy nhiên, người nuôi trồng thủy sản thường phải đối đầu với những tổn thất nặng nề do dịch bệnh gây ra. Trong số các nhóm vi sinh vật gây bệnh thủy sản thì các vi khuẩn thuộc chi *Vibrio* (các vibrio) được biết đến nhiều nhất là nguyên nhân gây ra nhiều loại bệnh và gây chết cho thủy hải sản. Kháng sinh và hóa chất đã được sử dụng để phòng trị bệnh các bệnh gây ra do các vibrio trong thời gian dài, dẫn đến tình trạng “nhờn thuốc”, làm cho các bệnh trở nên phức tạp, khó chữa hơn, và môi trường nuôi tồn dư kháng sinh. Do vậy, cần có các giải pháp phòng trị bệnh thay thế cho kháng sinh. Một trong những giải pháp tiềm năng là tác động đến hệ thống quorum sensing của các vi khuẩn vibrio. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tìm hiểu cách chuyển plasmid pCR2.1QRR mang cấu trúc gen *qrr-vibrio* ức chế quorum sensing vào tế bào vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* PAM17 bằng phương pháp điện biến nạp. Sau biến nạp, tỷ lệ khuẩn lạc thu được mang plasmid chứa gen là 5/20, chứng tỏ việc chuyển cấu trúc gen bằng phương pháp điện biến nạp là khả thi. Chúng mang plasmid tái tổ hợp hầu như mất khả năng di động, và suy giảm khả năng tạo biofilm 2 lần so với chủng gốc (kiểu đại) và chủng chỉ mang vector. Như vậy, kết quả chuyển gen cũng cho thấy rõ tác dụng ức chế quorum sensing ở vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của cấu trúc gen *qrr-vibrio*.

Từ khóa: Ức chế quorum-sensing, bệnh thủy sản, vibriosis, vi khuẩn *Vibrio*.

1. Mở đầu

Ngành nuôi trồng thủy sản, vốn đóng vai trò quan trọng đối với nền kinh tế quốc dân của Việt Nam, thường phải đối đầu với những tổn thất nặng nề do dịch bệnh gây ra. Trong số các nhóm vi sinh vật gây bệnh thủy sản thì các vi khuẩn thuộc chi *Vibrio* (thường gọi tắt là các

vibrio) được biết đến là nguyên nhân gây ra nhiều loại bệnh (gọi chung là các bệnh vibriosis) với tỷ lệ gây chết cao cho thủy hải sản [1]. Cũng như các nhóm vi khuẩn khác, các vibrio xâm nhiễm vào vật chủ và phát triển đến một mức độ nhất định về số lượng tế bào, sẽ gây nên các tổn thương cho vật chủ như: gây hoại tử mô, gây phù nề, xuất huyết dạ dày,... sau đó làm giảm sức sống của vật chủ, và gây chết [1]. Để kiểm soát các bệnh thủy sản do vi khuẩn nói chung và các vibrio nói riêng gây ra, biện pháp thông thường trước đây là sử dụng các thuốc

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-943318978.

Email: hai.phamthe@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4619>

kháng sinh. Tuy nhiên, với sự lạm dụng thuốc kháng sinh dẫn đến nguy cơ kháng thuốc ngày càng cao của vi khuẩn và hệ quả là việc sử dụng thuốc kháng sinh trong sản xuất thủy sản bị cấm bởi nhiều nước trên thế giới, một nhu cầu cấp thiết đặt ra là cần tìm kiếm những giải pháp mới “phi kháng sinh” để kiểm soát các tác nhân gây bệnh thủy sản, bao gồm cả các vibrio.

Con đường mà các tế bào vibrio liên lạc với nhau qua các phân tử tín hiệu chính là quorum sensing [2]. Nhờ quorum sensing, vi khuẩn có thể kích hoạt các gen mã hóa cho các protein tham gia vào sự hình thành màng sinh học, tạo bào tử, phát sáng, sản xuất kháng sinh, tiết ra các độc tố... Như vậy, để làm bất hoạt các gen gây độc thì việc làm gián đoạn hệ thống quorum sensing có thể được coi là một hướng đi mới “phi kháng sinh” để phòng chống các bệnh vibriosis.

Dựa trên những công bố trước đây và những hiểu biết về cơ chế phân tử của quorum sensing, chúng tôi đã thiết kế và tạo thành công một cấu trúc gen làm ức chế quorum-sensing ở vi khuẩn *Vibrio* và nhân dòng trong vi khuẩn *E. coli*, kí hiệu là gen *qrr-vibrio*. Tuy nhiên, tác dụng thực sự của cấu trúc gen này ở vi khuẩn *Vibrio* cần được kiểm chứng. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tìm giải pháp phù hợp để chuyển và biểu hiện cấu trúc gen nói trên vào vi khuẩn *Vibrio*, đại diện là *Vibrio parahaemolyticus*, loài gây bệnh thủy sản tiêu biểu.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Plasmid pCR2.1QRR (được tạo bằng cách chèn đoạn gen *qrr-vibrio* có khả năng gây ức chế quorum-sensing ở vi khuẩn *Vibrio* đã được thiết kế trước đây vào plasmid pCR2.1 (trong bộ “TA cloning kit with pCRTM2.1 vector”, Thermo Scientific, Mỹ) và nhân dòng trong *E. coli*). Chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* PAM17 (NBRC12711, NBRC, Nhật Bản) được sử dụng trong nghiên cứu. Các hóa chất sinh học phân tử sử dụng cho thí nghiệm điện biến nạp và kiểm tra sản phẩm

sau biến nạp như: DreamTaq Green PCR Master mix 2X (Thermo, Mỹ); môi nuôi M13F (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3', cung cấp bởi IDT, Mỹ); môi ngược BamHIR (5'-GGA TCC AAA AAA AGC CAA CCA-3', cung cấp bởi IDT, Mỹ); HydraGreen Safe DNA Dye 20.000X (ACTGene, Mỹ). Ngoài ra, nghiên cứu còn sử dụng các hóa chất khác: Agarose, môi trường Luria Bertani (LB) được cung cấp bởi Sigma, Merk.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Điện biến nạp

Chuẩn bị tế bào: một khuẩn lạc chủng *Vibrio parahaemolyticus* PAM17 được cấy vào 100 ml môi trường LB dịch thể chứa 3% NaCl, nuôi lắc qua đêm (16 giờ) ở 37°C. Sau đó, 200 µl dịch nuôi lắc đổ cho vào 30 ml môi trường LB 3% NaCl tiếp tục nuôi lắc ở 37°C cho đến khi đạt giá trị OD_{600nm} ~ 0,8 - 0,9. Ly tâm 6000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, bỏ dịch nổi, thu cặn. Cặn được hòa tan lại bằng 30 ml đệm EB (0,5 M sorbitol, 0,5 M manitol, 10% glycerol) lạnh. Lặp lại bước ly tâm, thu cặn và bổ sung đệm EB 3 lần, cuối cùng thu cặn tế bào và hòa tan cặn bằng 200 µl - 600 µl đệm EB lạnh, thu được tế bào khả biến.

Biến nạp: 200 µl tế bào khả biến được trộn với 10 µl plasmid chứa đoạn gen thiết kế, trộn đều và ủ trên nước đá trong 10 phút, đặt vào máy điện biến nạp (Gene Pulser XcellTM Electroporation Systems, Bio-Rad, Mỹ) và thiết lập hiệu điện thế phù hợp. Hút nhẹ nhàng mẫu ra ống eppendorf và bổ sung ngay 450 µl LB 3% NaCl vào hỗn hợp vừa xử lý xung điện, đem ủ 37°C trong 45 - 60 phút. Lấy 100 µl tế bào vừa được ủ ở trên đem cấy trải lên đĩa petri chứa môi trường LB 3% NaCl chứa 1% kháng sinh ampicillin, nuôi trong tủ ấm 37°C qua đêm. Sau khi đĩa cấy trải đã mọc lên các khuẩn lạc, chọn một số khuẩn lạc và kiểm tra sự có mặt của plasmid tái tổ hợp bằng phương pháp PCR.

2.2.2. Kiểm tra sản phẩm biến nạp

Việc tách plasmid từ các khuẩn lạc thu được sau biến nạp được thực hiện theo David S

Holmes [3]. Chọn một số khuẩn lạc đã mọc lại trên đĩa môi trường LB 3%NaCl chứa kháng sinh, để nhận số lượng tế bào bằng cách cấy ria lại trong điều kiện vô trùng trên đĩa môi trường LB 3%NaCl nuôi qua đêm ở 30°C. Tế bào được thu và pha loãng bằng nước MiliQ vô trùng và xử lý nhiệt ở 100°C trong 5 phút, sau đó đem ly tâm 8000 vòng/phút trong 15 phút. Plasmid tái tổ hợp trong dịch nổi được phát hiện bằng phản ứng PCR với cặp mồi M13F & BamHIR để kiểm tra sự có mặt của đoạn gen *qrr-vibrio*. Thành phần phản ứng: Taq PCR mix 12,5 µl; mồi xuôi M13F (10 µM) 1 µl; mồi ngược BamHIR (10 µM) 1 µl; ADN template 1 µl; nước PCR 9,5 µl; tổng thể tích phản ứng 25 µl. Chu kỳ nhiệt (1: 95°C 5 phút; 2: 95°C 45 giây, 52°C 45 giây, 72°C 1 phút, lặp lại 30 chu kỳ; 3: 72°C 5 phút).

2.2.3. Kiểm tra biểu hiện kiểu hình của chủng tái tổ hợp

Việc kiểm tra biểu hiện kiểu hình của chủng *V. parahaemolyticus* tái tổ hợp được thực hiện bằng phương pháp nuôi cấy vi sinh vật truyền thống trên môi trường LB 3% NaCl, quan sát hình thái, đánh giá khả năng di động và đánh giá khả năng tạo biofilm.

Khả năng di động (bơi) của *V. parahaemolyticus* và *V. parahaemolyticus* tái tổ hợp được kiểm tra và so sánh bằng cách cấy chấm bằng tăm vô trùng trên môi trường LB 3% NaCl: 0,2% agar, trong thời gian 24 giờ.

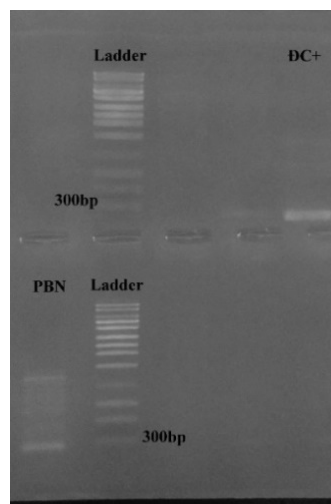
Khả năng tạo biofilm của các chủng được kiểm tra trên cơ sở tham khảo phương pháp của Elexson và cộng sự [4] và có sự cải biến để phù hợp với điều kiện thực tế. Phương pháp cụ thể như sau: Nuôi lác chủng *V. parahaemolyticus* tái tổ hợp trong môi trường LB+ muối biển (tỉ lệ 1:1). Hút 500 µl dịch nuôi cấy vào mỗi ống eppendorf và nuôi trong tủ ấm 37°C trong khoảng 40 giờ. Gạn bỏ dịch nổi và thu cặn tế bào bám trên thành ống. Rửa sạch 3 lần bằng đệm PBS để loại bỏ tất cả tế bào không bám trên biofilm. Thêm 500 µl nước cất vào ống, trộn mạnh bằng máy vortex cho tế bào tan đều. Đo OD_{600nm} để xác định lượng tế bào tạo thành trong biofilm của mỗi chủng.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Điện biến nạp



Hình 1. Hình ảnh khuẩn lạc *Vibrio parahaemolyticus* sau khi biến nạp và nuôi cấy trên môi trường LB 3% NaCl có bổ sung ampicillin (khuẩn lạc trắng nhỏ ở đầu mũi tên).



Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR plasmid bằng cặp mồi (M13F & BamHIR). ĐC+ là đối chứng dương (băng sản phẩm PCR của pCR2.1QRR). PBN là băng sản phẩm PCR của *V. parahaemolyticus* tái tổ hợp, có kích thước sản phẩm tương đương với kích thước sản phẩm đối chứng dương.

Sau khi biến nạp bằng xung điện, các tế bào khả biến được nuôi cấy trên môi trường LB 3% NaCl chứa 1% kháng sinh ampicillin, nhiệt độ 37°C và sau 16 giờ trên đĩa đã xuất hiện những khuẩn lạc có màu đục (Hình 1). Sau khi tách

plasmid của hơn 20 khuẩn lạc mọc trên đĩa, đã thu được 5 dòng khuẩn lạc tái tổ hợp (mang plasmid pCR2.1QRR), dựa trên kết quả kiểm tra sự có mặt của gen *qrr-vibrio* bằng PCR. Chúng tôi đã lựa chọn ra một dòng khuẩn lạc tái tổ hợp cho kết quả rõ nét nhất, kí hiệu là PBN (Hình 2) để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Biểu hiện kiểu hình của chủng *Vibrio parahaemolyticus* tái tổ hợp

3.2.1. Khả năng di động

Kết quả thí nghiệm thử khả năng di động trên môi trường thạch bán lỏng cho thấy khả năng di động của chủng *V. parahaemolyticus* tái tổ hợp (PBN) giảm hơn nhiều so với chủng *V. parahaemolyticus* PAM17 ban đầu (Hình 3). Đối chứng (chủng được biến nạp với vector pCR2.1, nghĩa là không mang cấu trúc gen ức chế quorum sensing) không hề mất khả năng di động (xem chủng VP-, Hình 3), chủng tổ plasmid không gây ra ảnh hưởng gì.

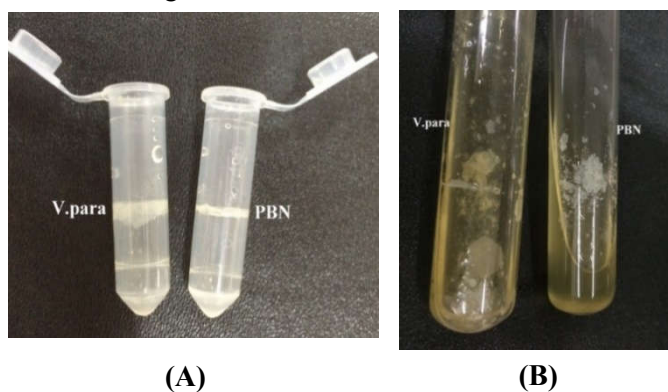
3.2.2. Khả năng tạo màng sinh học (biofilm)

Thí nghiệm được thực hiện cả trong ống eppendorf (vật liệu polypropylene) và ống nghiệm (vật liệu thủy tinh) để đánh giá mức độ tạo biofilm trên mỗi loại bề mặt vật liệu khác nhau. Trên cả 2 loại vật liệu, chủng PBN đều

tạo biofilm ít hơn. Điều này được thể hiện qua hình ảnh thực tế (Hình 4) và kết quả đo lường tế bào tạo thành biofilm: Lượng tế bào tạo thành biofilm của chủng *V. parahaemolyticus* PAM17 (chỉ mang vector pCR2.1) và chủng *V. parahaemolyticus* đối chứng (với OD_{600nm} tương ứng là 0.18 ± 0.03 và 0.178 ± 0.03) nhiều hơn gấp hơn 2 lần so với lượng tế bào tạo thành biofilm của chủng *V. parahaemolyticus* tái tổ hợp ($OD_{600nm} = 0,076 \pm 0,02$).



Hình 3. Khả năng di động trên môi trường LB 3% NaCl bán lỏng. Chú thích: V. para- là chủng *Vibrio parahaemolyticus* được biến nạp plasmid pCR2.1. V. para là chủng *Vibrio parahaemolyticus* PAM17. Chủng PBN (PBN) là chủng *Vibrio parahaemolyticus* tái tổ hợp. (Nên tăng kích thước của các chú thích hình lớn hơn).



Hình 4. Khả năng tạo màng sinh học trong môi trường LB dịch thể của (PBN) và chủng *Vibrio parahaemolyticus* PAM17 (V. para). (A) là hình ảnh nuôi cấy trong ống eppendorf. (B) là hình ảnh nuôi cấy trong ống nghiệm. Chú thích: Trên thành ống eppendorf, biofilm của chủng *V. parahaemolyticus* PAM17 dày và lan rộng hơn, còn biofilm của chủng PBN ít và mỏng hơn. Kết quả tương tự như vậy trên thành ống nghiệm.

4. Thảo luận

Nhìn chung, có thể thấy rõ những khác biệt về biểu hiện kiểu hình của chủng *V. parahaemolyticus* tái tổ hợp so với chủng gốc (kiểu đại). Kết quả kiểm tra khả năng di động cho thấy, khả năng bơi - swarming của chủng tái tổ hợp gần như không còn biểu hiện. Khả năng hình thành biofilm của chủng tái tổ hợp cũng đã giảm đi nhiều so với chủng gốc ban đầu. Từ những kết quả này, chúng tôi có thể đưa ra giả thuyết rằng, chính đoạn gen thiết kế được đưa vào tế bào đã tác động đến quorum sensing của chủng *V. parahaemolyticus* và làm nên sự thay đổi về biểu hiện kiểu hình của chủng tái tổ hợp so với chủng gốc. Điều này rất phù hợp với những công bố trước đây về quorum sensing ở các vibrio. *Vibrio parahaemolyticus* trải qua biến đổi nào đó sẽ hình thành nên 2 dạng khuẩn lạc khác nhau: opaque (OP) và translucent (TR) [5]. Dạng khuẩn lạc TR là dạng khuẩn lạc có màu trắng trong, có xu hướng lan rộng ra xung quanh; dạng này có khả năng gây độc. Dạng khuẩn lạc OP là dạng khuẩn lạc có màu trắng đục, không lan ra xung quanh; dạng này ít gây độc [6]. Theo nghiên cứu của Enos-Berlage và cộng sự năm 2005, dạng khuẩn lạc OP hình thành màng capsule dày xung quanh tế bào, lớp polysaccharide của capsule (CPS) này làm cho khuẩn lạc có độ dính và màu đục [7]. Đối chiếu có thể thấy khuẩn lạc chủng *V. parahaemolyticus* PAM17 có dạng khuẩn lạc TR, còn chủng *V. parahaemolyticus* tái tổ hợp có dạng khuẩn lạc OP. Từ sự thay đổi về sự biểu hiện ra kiểu hình, có thể suy ngược lại rằng, đoạn gen thiết kế được đưa vào tế bào đã có tác dụng làm hạn chế quorum sensing của chủng *V. parahaemolyticus* tái tổ hợp.

5. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chuyển thành công plasmid tái tổ hợp đã mang gen *qrr-vibrio* gây ức chế quorum sensing vào tế

bào chủng *V. parahaemolyticus* PAM17 bằng phương pháp điện biến nạp. Như vậy, chúng tôi đã xây dựng được phương pháp làm nền tảng cho các nghiên cứu tương tự về sau. Bên cạnh đó, chúng tôi đã bước đầu đánh giá được sự biểu hiện kiểu hình của cấu trúc gen *qrr-vibrio* trên chủng *V. parahaemolyticus* tái tổ hợp. Kết quả cho thấy chủng này bị hạn chế khả năng di động và giảm khả năng hình thành biofilm, đồng nghĩa với giả thuyết rằng sự biểu hiện cấu trúc gene *qrr-vibrio* có tác dụng ức chế quorum sensing của vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.

Tài liệu tham khảo

- [1] Cabello FC. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol.* 1137-1144. PubMed ISI, ChemPort
- [2] Waters, C.M., Bassler, 2005. Cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*; 21:319-346. PubMed.
- [3] David S. Holmes, Michael Quigley. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Elsevier. Volume 114, Issue 1, Pages 193-197.
- [4] Elexson, N. Yaya, R. Nor, A. M., Kantilal, H. K., Ubong, A., Yoshitsugu, N., Nishibuchi, M. and Son, R. 2013. Biofilm assessment of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood using Random Amplified Polymorphism DNA-PCR. *International Food Research Journal* 21(1). 59-65.
- [5] Cindy J. Gode-Potratz and Linda L. McCarter, 2011. Quorum Sensing and Silencing in *Vibrio parahaemolyticus*. *American Society for Microbiology*. Vol. 193, No. 16. p. 4224-4237.
- [6] Gode-Potratz CJ, Mc Carter LL. Quorum sensing and silencing in *Vibrio parahaemolyticus*. *JBacteriol.* 2011; 193(16): 4224-37. Epub 2011/06/24. doi:10.1128/JB.00432-11 PMID:21705592
- [7] Enos-Berlage, J. L., Z. T. Guvener, C. E. Keenan, and L. L. McCarter. 2005. Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol. Microbiol.* 55:1160-1182.

Development of a Method to Transfer a Quorum-Sensing Inhibiting Gene Construct Into a *Vibrio parahaemolyticus* Strain

Nguyen Thi Thu Thuy, Nguyen Thi Thu Huyen, Pham The Hai

Faculty of Biology, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

Abstract: In recent years, aquaculture in Vietnam has been expanding and becoming an important domestic economic sector. However, diseases of aquaculture animals are always a great threat to this industry. Vibrios - a group of aquatic bacterial pathogens, are known for causing serious diseases (vibriosis) and killing aquatic organisms. Due to the long-term use of antibiotics and chemicals to treat vibriosis and other diseases, antibiotic-resistance has widely spread among pathogens, leading to complicated developments of diseases, difficulties in treatment and the increasing antibiotic residues in the environment. Therefore, other preventive methods replacing the use of antibiotics is urgently needed. A potential approach is to interrupt the quorum sensing processes in vibrios. In this study, we investigated the method of electroporation for transferring pCR2.1QRR plasmid harbouring *qrr-vibrio*, a gene cluster designed previously that potentially inhibits quorum sensing in vibrios, into cells of *Vibrio parahaemolyticus* strain PAM17. The ratio of the number of plasmid-carrying colonies to the total number of grown colonies was 5/20, suggesting that the use of electroporation for the plasmid transfer is feasible. The recombinant strain almost lost its mobility, and its capability of biofilm formation was 2-fold reduced in comparison with those of the original strain (the wild type) and the strain carrying only the vector. Thus, the results clearly showed a quorum-sensing inhibitory effect conferred by *qrr-vibrio*.

Keywords: Quorum-sensing, aquatic animal diseases, vibriosis.