

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**  
-----



**Ngô Thị Huyền**

**NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN KHÁNG NGUYÊN TÁI TỔ HỢP VÀ  
ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG SINH MIỄN DỊCH CỦA OmpK VÀ OmpU  
NHẪM PHÁT TRIỂN VACCINE PHÒNG BỆNH DO  
*Vibrio parahaemolyticus* và  
*Vibrio alginolyticus* GÂY RA TRÊN CÁ MÚ**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

***Hà Nội - 2024***

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

---



Ngô Thị Huyền

NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN KHÁNG NGUYÊN TÁI TỔ HỢP VÀ  
ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG SINH MIỄN DỊCH CỦA OmpK VÀ OmpU  
NHẪM PHÁT TRIỂN VACCINE PHÒNG BỆNH DO *Vibrio*  
*parahaemolyticus* VÀ *Vibrio alginolyticus* GÂY RA TRÊN CÁ MÚ

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Mã số : 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. PGS. TS. Đồng Văn Quyền
2. TS. Vũ Thị Bích Huyền

Hà Nội – 2024

## LỜI CAM ĐOAN

*Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.*

*Hà Nội, ngày tháng năm 2024*

**Học viên**



**Ngô Thị Huyền**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến PGS. TS. Đồng Văn Quyền và TS. Vũ Thị Bích Huyền đã tận tình, hướng dẫn, chỉ bảo, giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện và hoàn thành luận văn thạc sĩ. Đặc biệt, tôi xin gửi lời cảm ơn đến cán bộ phòng Vi sinh vật học phân tử, Viện Công nghệ sinh học- Viện Hàn lâm KHCN Việt Nam và thầy cô trong bộ môn Di truyền – Hóa sinh, khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội đã giúp đỡ, tạo điều kiện để tôi có thể hoàn thành luận văn.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến Bộ Giáo dục và Đào tạo với đề tài “Nghiên cứu phát triển vaccine vector phòng bệnh do *Vibrio* spp. gây ra cho cá mú nuôi lồng” mang mã số B2022 – SPH – 14 đã cấp kinh phí cho tôi có thể thực hiện các nghiên cứu trong luận văn.

Ngoài ra, tôi đã may mắn được nhận học bổng Odon Vallet năm 2022, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới quỹ học bổng. Với tôi, đây không chỉ là hỗ trợ to lớn về kinh phí mà còn là sự động viên, khích lệ cho tôi thêm động lực theo đuổi sự nghiệp của mình.

Tôi xin trân trọng cảm ơn ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng, khoa Công nghệ Sinh học của Học viện KHCN, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và các quý thầy cô đã giúp đỡ, truyền đạt cho tôi những kiến thức quý báu trong quá trình học tập và thực hiện luận văn tốt nghiệp.

Cuối cùng, tôi xin được cảm ơn gia đình, bạn bè đã luôn bên cạnh, động viên, ủng hộ và khích lệ tôi trong những năm qua. Tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ quý báu đó!

Hà Nội, ngày tháng năm 2024

Học viên

Ngô Thị Huyền

## MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN .....	i
LỜI CẢM ƠN .....	ii
MỤC LỤC .....	iii
DANH MỤC CÁC BẢNG .....	viii
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ .....	ix
MỞ ĐẦU .....	1
Mục đích nghiên cứu .....	2
Nội dung nghiên cứu .....	2
Ý nghĩa khoa học .....	3
Ý nghĩa thực tiễn .....	3
<b>Chương 1: TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1. TỔNG QUAN VỀ CÁ MÚ CHẤM CAM <i>Epinephelus coioides</i> .....</b>	<b>4</b>
1.1.1. Đặc điểm sinh học .....	4
1.1.2. Tình hình nghề nuôi cá mú .....	5
<b>1.2. TỔNG QUAN VỀ VI KHUẨN <i>Vibrio</i> spp. ....</b>	<b>6</b>
1.2.1. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	6
1.2.2. <i>Vibrio alginolyticus</i> .....	9
<b>1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VACCINE PHÒNG BỆNH DO <i>Vibrio</i> spp. GÂY RA .....</b>	<b>12</b>
1.3.1. Trên thế giới .....	12
1.3.2. Tại Việt Nam .....	14
<b>1.4. HỆ THỐNG DÙNG ĐỂ BIỂU HIỆN GENE KHÁNG NGUYÊN .....</b>	<b>14</b>
1.4.1. Hệ thống biểu hiện <i>E. coli</i> .....	14
1.4.2. Vector biểu hiện pET28a(+) .....	15
<b>Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1. ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI VÀ VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>16</b>
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu .....	16
2.1.2. Phạm vi nghiên cứu .....	16

2.1.3.	Vật liệu nghiên cứu.....	16
2.1.4.	Hóa chất.....	16
2.1.5.	Thiết bị.....	17
<b>2.2.</b>	<b>SƠ ĐỒ THỰC HIỆN THÍ NGHIỆM.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3.</b>	<b>PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>18</b>
2.3.1.	Phương pháp phân lập các chủng vi khuẩn <i>Vibrio</i> spp. từ mẫu cá bệnh và nước nuôi thủy sản.....	18
2.3.2.	Phương pháp nhuộm Gram, đánh giá chỉ tiêu sinh hóa và tính kháng kháng sinh của vi khuẩn.....	19
2.3.3.	Phương pháp đánh giá độc lực của các chủng vi khuẩn.....	21
2.3.4.	Phương pháp định danh chủng vi khuẩn bằng gene 16S rRNA.....	21
2.3.5.	Phương pháp xác định giá trị LD50.....	22
2.3.6.	Phương pháp giữ giống.....	22
2.3.7.	Phương pháp xác định trình tự gene kháng nguyên.....	22
2.3.8.	Phương pháp tạo protein tái tổ hợp mang gene kháng nguyên.....	23
2.3.9.	Phương pháp biểu hiện gene đích trong <i>E. coli</i> BL21.....	26
2.3.10.	Phương pháp thu và tinh sạch protein tổng số.....	26
2.3.12.	Phương pháp đánh giá khả năng tạo đáp ứng miễn dịch của protein tái tổ hợp trên cá mú.....	28
2.3.13.	Phương pháp xử lý số liệu.....	28
	<b>Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1.</b>	<b>Phân lập các chủng vi khuẩn <i>Vibrio</i> spp. từ mẫu cá bệnh và nước nuôi thủy sản.....</b>	<b>29</b>
3.1.1.	Phân lập vi khuẩn trên môi trường chọn lọc.....	29
3.1.2.	Phân tích đặc điểm sinh hóa của các mẫu phân lập.....	32
3.1.3.	Đánh giá đặc tính kháng một số loại kháng sinh của các mẫu phân lập.....	35
<b>3.2.</b>	<b>Đánh giá khả năng gây bệnh trên cá mú chấm cam của các mẫu vi khuẩn phân lập được.....</b>	<b>37</b>
<b>3.3.</b>	<b>Định danh mẫu các chủng <i>Vibrio</i> spp. phân lập bằng gene 16S rRNA ...</b>	<b>39</b>
<b>3.4.</b>	<b>Xác định giá trị LD50 của 8 chủng vi khuẩn phân lập.....</b>	<b>40</b>

<b>3.5. Xác định trình tự gene kháng nguyên <i>OmpK</i> và <i>OmpU</i> của chủng vi khuẩn <i>V. alginolyticus</i> .....</b>	<b>46</b>
<b>3.6. Tách dòng, biểu hiện gene kháng nguyên <i>OmpK</i> và <i>OmpU</i> trong <i>E. coli</i> 50</b>	<b>50</b>
3.6.1. Nhân dòng gene kháng nguyên.....	50
3.6.2. Thiết kế vector pET28a(+) tái tổ hợp để biểu hiện gene <i>OmpK</i> , <i>OmpU</i> trong <i>E. coli</i> .....	51
3.6.3. Kết quả biểu hiện và tinh sạch <i>OmpK</i> và <i>OmpU</i> trong <i>E. coli</i> BL21 (DE3) .....	54
<b>3.7. Đánh giá khả năng tạo đáp ứng miễn dịch của protein tái tổ hợp ở cá mú .....</b>	<b>56</b>
<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>58</b>
<b>KẾT LUẬN .....</b>	<b>58</b>
<b>KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>58</b>
<b>DANH MỤC CÁC TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>60</b>
<b>PHỤ LỤC .....</b>	<b>67</b>

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CÁC CHỮ VIẾT TẮT

<b>Chữ viết tắt</b>	<b>Tên đầy đủ</b>	<b>Tên tiếng việt</b>
AK30	Amikacin 30 µg	
AM25	Ampicillin 25 µg	
AML10	Amoxicillin 10 µg	
APS	Ammonium persulfate	
ATM30	Aztreonam 30 µg	
C30	Chloramphenicol 30 µg	
CIP5	Ciprofloxacin 5 µg	
DO30	Doxiciline 30 µg	
EFT30	Ceftiofur 30 µg	
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent assay	
ENR5	Enrofloxacin 5 µg	
FFC30	Florfenicol 30 µg	
His	Histidine	
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside	
LB	Luria-Bertani medium	Môi trường Luria-Bertani
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Trung tâm thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia
OD	Optical Density	Mật độ quang học
Omp	Outer membrane protein	Protein màng ngoài
OTC30	Oxytetracycline 30 µg	



PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
RA10	Rifampicin 10 µg	
S10	Streptomycin 10 µg	
SDS	Sodium dodecyl sulfate	
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis	Điện di trên polyacrylamide
TAE	Tris-acid acetic-EDTA	Dung dịch đệm TAE
TCBS	Thiosulfate citrate bile salts sucrose	
TEMED	N, N, N', N' – tetramethyl – ethylenediamine	
v/v	Volume/volume	Thể tích/thể tích
VASEP	Vietnam Association of Seafood Exporters and Producers	Hiệp hội Chế biến và Xuất khẩu Thủy sản Việt Nam
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indoly-β-D- galactoside	

## DANH MỤC CÁC BẢNG

<i>Bảng 1.1. Đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn <i>V. parahaemolyticus</i> .....</i>	7
<i>Bảng 1.2. Đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn <i>V. alginolyticus</i> .....</i>	9
<i>Bảng 2.1. Thành phần phản ứng gắn gene vào pGEM®-T Easy Vector.....</i>	23
<i>Bảng 2.2. Thành phần phản ứng gắn gene vào pCE2 TA/Blunt-Zero.....</i>	23
<i>Bảng 2.3. Thành phần phản ứng PCR kiểm tra các dòng vi khuẩn mang gene <i>OmpK</i> và <i>OmpU</i> .....</i>	24
<i>Bảng 2.4. Thành phần cắt plasmid bằng enzyme cắt giới hạn <i>HindIII</i> và <i>BamHI</i>...</i>	25
<i>Bảng 2.5. Xử lý vector <i>pET28a(+)</i> bằng enzyme cắt giới hạn <i>HindIII</i> và <i>BamHI</i> ...</i>	25
<i>Bảng 2.6. Gắn gene vào vector biểu hiện <i>pET-28a</i> .....</i>	25
<i>Bảng 2.7. Thành phần và các dung dịch đệm SDS-PAGE.....</i>	27
<i>Bảng 3.1. Các vi khuẩn phân lập từ nước nuôi thủy sản .....</i>	29
<i>Bảng 3.2. Các vi khuẩn phân lập từ mẫu cá bệnh .....</i>	30
<i>Bảng 3.3. Một số đặc điểm sinh hóa của 22 mẫu <i>Vibrio</i> phân lập được.....</i>	33
<i>Bảng 3.4. Đặc tính kháng 10 loại kháng sinh của vi khuẩn <i>Vibrio</i> phân lập.....</i>	35
<i>Bảng 3.5. Chúng vi khuẩn phân lập được định danh.....</i>	40
<i>Bảng 3.6. Giá trị LD50 của 4 chủng vi khuẩn thuộc loài <i>V. alginolyticus</i>.....</i>	40
<i>Bảng 3.7. Giá trị LD50 của 4 mẫu vi khuẩn thuộc loài <i>V. parahaemolyticus</i>.....</i>	43
<i>Bảng 3.8. Thiết kế các cặp môi cho phản ứng PCR.....</i>	46
<i>Bảng 3.9. Các chủng <i>Vibrio</i> dùng để so sánh mức độ tương đồng trình tự gene <i>OmpU</i> và gene <i>OmpK</i> .....</i>	48
<i>Bảng 3.10. Đáp ứng miễn dịch của cá mú chấm cam sau khi tiêm protein tái tổ hợp mang gene kháng nguyên sau 45 ngày.....</i>	57

## DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 2.1. Sơ đồ vector biểu hiện pET28a(+) mang gene mã hóa protein OmpK/OmpU .....	26
Hình 3.1. Hình thái khuẩn lạc <i>Vibrio</i> spp. phân lập đại diện trên môi trường TCBS (I) và Chromagar <sup>TM</sup> Vibrio (II) .....	32
Hình 3.2. Đặc điểm sinh hóa của mẫu phân lập của 2 mẫu đại diện A2 và HP4.....	34
Hình 3.3. Phản ứng sinh catalase làm sủi bọt của mẫu đại diện A2 (A) và mẫu HP4 (B).....	34
Hình 3.4. Kết quả đánh giá khả năng gây hiện tượng tan huyết trên môi trường thạch máu của chủng vi khuẩn A2 (A), phản ứng di động trên môi trường bán lỏng của các chủng A2, T4, QN6 (B).....	35
Hình 3.5. Kết quả xác định đường kính vòng kháng khuẩn ở một số loại kháng sinh của chủng vi khuẩn TB3 .....	36
Hình 3.6. Tỷ lệ % sống sót của cá mú sau khi bị gây nhiễm sau 14 ngày với các mẫu <i>V. alginolyticus</i> (A) và <i>V. parahaemolyticus</i> (B) phân lập ở nồng độ $10^7$ CFU/ml .	38
Hình 3.7. Hình ảnh cá bị chết do vi khuẩn <i>V. parahaemolyticus</i> N9 (A) và <i>V. alginolyticus</i> (B).....	39
Hình 3.8. Kết quả điện di sản phẩm PCR gene 16S rRNA của 8 mẫu vi khuẩn trên gel agarose 1%. .....	39
Hình 3.9. Biểu đồ tỷ lệ cá chết cộng dồn thí nghiệm xác định giá trị LD50 trên cá mú chấm cam gây nhiễm 4 chủng vi khuẩn A2, N5, A10 và N10 .....	43
Hình 3.10. Biểu đồ tỷ lệ cá chết cộng dồn thí nghiệm xác định giá trị LD50 trên cá mú chấm cam gây nhiễm 4 mẫu vi khuẩn N9, T4, H5 và QN4.....	46
Hình 3.11. Điện di sản phẩm pcr nhân gene .....	47
Hình 3.13. So sánh trình tự protein suy diễn gene <i>OmpK</i> của vi khuẩn <i>V. parahaemolyticus</i> N9 với gene <i>OmpK</i> của các loài <i>Vibrio</i> .....	49
Hình 3.14. So sánh trình tự protein suy diễn gene <i>OmpU</i> của vi khuẩn <i>V. alginolyticus</i> A2 với gene <i>OmpU</i> của các loài <i>Vibrio</i> .....	49
Hình 3.15. So sánh trình tự protein suy diễn gene <i>OmpU</i> của vi khuẩn <i>V. parahaemolyticus</i> N9 với gene <i>OmpU</i> của các loài <i>Vibrio</i> .....	50
Hình 3.16. Kết quả điện di đại diện sản phẩm cắt plasmid tái tổ hợp pGEM-K và pCE2-U mang gene ngoại lai bằng enzyme cắt giới hạn <i>Bam</i> HI và <i>Hind</i> III.....	51

Hình 3.17. Kết quả điện di sản phẩm cắt các plasmid pET28a(+) tái tổ hợp mang gene kháng nguyên <i>OmpK</i> , <i>OmpU</i> sau khi xử lý bằng <i>Bam</i> HI và <i>Hind</i> III .....	52
Hình 3.18. Trình tự nucleotide và khung đọc mở gene <i>OmpK</i> .....	53
Hình 3.19. Trình tự nucleotide và khung đọc mở gene <i>OmpU</i> .....	53
Hình 3.20. Kết quả biểu hiện <i>OmpK</i> . A. Dịch protein tổng số từ mẫu không cảm ứng (1) và mẫu được cảm ứng IPTG (2) .....	54
Hình 3.21. Kết quả biểu hiện <i>OmpU</i> .....	55
Hình 3.22. Kết quả tinh sạch protein <i>OmpU</i> (A) và <i>OmpK</i> (B) .....	56

## MỞ ĐẦU

Việt Nam là một quốc gia ven biển, có bờ biển dài trên 3.260 km trải dài từ Bắc xuống Nam, với hơn 3.000 hòn đảo lớn, nhỏ là lợi thế trong việc phát triển ngành thủy sản[1]. Theo Trung tâm tin học và Thống kê (Bộ Nông nghiệp và PTNT), tổng lượng thủy sản năm 2022 đạt 9 triệu tấn, tăng 2,7% so với năm 2021. Trong đó, khai thác thủy sản đạt 3,86 triệu tấn, nuôi trồng thủy sản đạt 5,19 triệu tấn [2]. Theo Hiệp hội chế biến và xuất khẩu thủy sản Việt Nam (VASEP), xuất khẩu thủy sản năm 2022 đạt 11 tỷ USD (tăng 23% so với năm 2021), chiếm 4-5% GDP, 9-10% tổng kim ngạch xuất khẩu quốc gia, lực lượng lao động chiếm hơn 4 triệu người, đứng thứ 5 về giá trị xuất khẩu. Thủy sản được xác định là ngành kinh tế mũi nhọn của quốc gia [3]. Trong giai đoạn 2015 – 2022, sản lượng thủy sản Việt Nam tăng 38% (từ 5,56 triệu tấn lên 9,05 triệu tấn). Trong đó, sản lượng nuôi trồng thủy sản tăng 47% (từ 3,53 triệu tấn lên 5,19 triệu tấn). Sản lượng khai thác thủy sản tăng 29% (từ 3 triệu tấn lên 3,86 triệu tấn) [3].

Nhiều loài cá có giá trị kinh tế được nuôi phổ biến ở nước ta như : cá mú (*Epinephelus* spp), cá bớp (*Rachycentron canadum*), cá hồng (*Lutjanus* spp.), . . . đã mang lại lợi ích kinh tế đáng kể cho người dân. Bên cạnh đó, ngành thủy sản Việt Nam cũng luôn phải đối mặt với những thách thức vì dịch bệnh. Theo báo cáo Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn trong 4 tháng đầu năm 2022 diện tích nuôi trồng thủy sản do dịch bệnh gây ra là 1.200 ha chủ yếu là các bệnh do *Vibrio* spp. gây ra như: bệnh hoại tử gan tụy cấp tính, gan thận mũ, xuất huyết . . . ở cá [4]. *Vibrio* spp. đã trở thành mối đe dọa đến số lượng lớn các loài cá kinh tế quan trọng [5]. Trong đó, bệnh do hai loài vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio alginolyticus* thuộc chi *Vibrio* phổ biến trên nhiều loài cá với động vật thủy sản với tỷ lệ chết trên cá lên tới 90% [6,7]

Bộ Cá vược (Perciformes) là một trong những bộ lớn nhất trong phân ngành động vật có xương sống (Vertebrate). Theo thống kê của Joseph S. Nelson (2006), bộ Cá vược có 160 họ, 1.539 chi, 10.033 loài. Trong đó, họ cá mú là một trong 8 họ có số lượng loài lớn nhất với 475 loài thuộc 64 chi [8]. Cá mú là nguồn lợi thủy sản quan trọng của các hệ sinh thái san hô và có tầm quan trọng về kinh tế, với hàm lượng dinh dưỡng cao, cá mú rất được ưa chuộng tại thị trường Nhật Bản, Hàn Quốc, Trung Quốc, Hồng Kông và một số nước khu vực Châu Mỹ. Ở phía Nam Trung Quốc và Hồng Kông giá cá mú lên tới 100 USD/kg [9].

Hiện nay, sử dụng thuốc kháng sinh để kiểm soát và điều trị bệnh do *Vibrio* spp gây ra trên động vật thủy sản là phương pháp phổ biến hiệu quả nhanh và giá

thành rẻ [10,11]. Tuy nhiên, việc lạm dụng kháng sinh và sử dụng kháng sinh không đúng cách đã dẫn đến tỉ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh tăng cao, dư lượng kháng sinh trong sản phẩm thủy sản ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng [11,12]. Do đó, sử dụng vaccine phòng bệnh không chỉ mang lại hiệu quả mà còn giúp phát triển bền vững ngành nuôi trồng thủy sản.

Một số loại vaccine phòng bệnh do vi khuẩn gây ra đã và đang được nghiên cứu và sử dụng cho thủy sản như: vaccine bất hoạt, vaccine sống giảm độc lực, vaccine tiểu đơn vị, vaccine tái tổ hợp, vaccine DNA và vaccine tổng hợp/peptide [13]. Trong đó, vaccine bất hoạt đã được nghiên cứu và phát triển thành công để phòng ngừa bệnh Vibriosis với tỷ lệ bảo hộ lên tới 88% sau khi nhiễm *V. vulnificus* [14]. Hiện nay đã có một vài loại vaccine bất hoạt thương mại phòng bệnh do một số loài *Vibrio* spp. nhưng loại vaccine này được đánh giá có thời gian bảo hộ ngắn. Trong các loại vaccine cho cá, vaccine tái tổ hợp được xem là vaccine có tiềm năng và được đánh giá cao về tính an toàn [14]. Cai và cộng sự (2010) cho rằng protein màng ngoài đóng vai trò quan trọng trong độc lực vi khuẩn và là ứng viên tiềm năng cho phát triển vaccine [15]. Nghiên cứu khả năng tạo đáp ứng miễn dịch của OmpU trên cá hồng (*Lutjanus erythropterus*) cho thấy tỉ lệ bảo hộ cao (96,43%), có khả năng tương đồng lên tới 92% so với protein OmpU của các loài *Vibrio* spp. khác. Một nghiên cứu khác về khả năng tạo đáp ứng miễn dịch của gene mã hóa protein OmpK trên cá đù vàng (*Yellow croaker*) cho thấy tỷ lệ bảo hộ lên tới 79,2%. Các nghiên cứu đều cho thấy OmpK và OmpU là ứng viên tiềm năng cho phát triển vaccine [15,16].

Từ những cơ sở lý luận và thực tiễn trên, đề tài “**Nghiên cứu biểu hiện kháng nguyên tái tổ hợp và đánh giá khả năng sinh miễn dịch của OmpK và OmpU nhằm phát triển vaccine phòng bệnh do *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio alginolyticus* gây ra trên cá mú**” được tiến hành thực hiện.

### **Mục đích nghiên cứu**

Biểu hiện được protein tái tổ hợp mã hóa bởi gene kháng nguyên *OmpK* và *OmpU* và đánh giá khả năng sinh miễn dịch của chúng với *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus* trên cá mú.

### **Nội dung nghiên cứu**

- Phân lập, định danh vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* từ cá mú nghi mắc bệnh do *Vibrio* spp.

- Tạo dòng và xác định trình tự gene mã hóa kháng nguyên OmpK và OmpU từ chủng *Vibrio* spp. phân lập được.
- Tạo dòng và biểu hiện gene mã hoá protein OmpK và OmpU trong *E. coli*.
- Đánh giá khả năng tạo đáp ứng miễn dịch của OmpK và OmpU để phòng *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus* trên cá mú chấm cam.

### ***Ý nghĩa khoa học***

Cung cấp thêm cơ sở dữ liệu về các chủng *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* gây bệnh cho các loài cá nuôi ở Việt Nam.

Cung cấp trình tự gene kháng nguyên. Đây là cơ sở khoa học và nguyên liệu di truyền để phát triển kit chẩn đoán, vaccine phòng bệnh do *Vibrio* spp. gây ra trên cá mú.

### ***Ý nghĩa thực tiễn***

Các kháng nguyên OmpK và OmpU tái tổ hợp là tiền đề phát triển vaccine phòng *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus* trên cá mú.

## Chương 1: TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

### 1.1. TỔNG QUAN VỀ CÁ MÚ CHẤM CAM *Epinephelus coioides*

#### 1.1.1. Đặc điểm sinh học

Cá mú chấm cam (*Epinephelus coioides*) là loài cá biển thuộc chi *Epinephelus* trong họ cá mú, được Hamilton mô tả lần đầu tiên vào năm 1822 [17].

Ngành: Vertebrata

Lớp: Osteichthys

Bộ: Perciformes

Họ: Serranidae

Chi: *Epinephelus*

Loài: *Epinephelus coioides*

Họ cá mú (Serranidae) là một trong 8 họ có số lượng loài đa dạng nhất của bộ cá Vược (Perciformes). Cá mú chấm cam có đặc điểm như miệng rộng, nhiều răng nhỏ, sắc nhọn, thân thuôn dài, hơi hẹp. Tuy nhiên, *E. coioides* có đặc điểm nhận biết riêng như vây đuôi mềm, tròn, vây hậu môn có 3 gai cứng và 8 tia mềm, vây bụng có 1 gai cứng và 5 tia mềm, vây ngực có 18 – 20 tia mềm, vây lưng có 11 gai cứng và 13 – 26 tia vây mềm. Vây trên cơ thể có hình lược, trừ bụng, ngực và vùng trên vây hậu môn. *E. coioides* có phần lưng màu nâu xám nhạt, có màu trắng ở hai bên và phía bụng, 5 vạch màu nâu xám chéo trên đầu và thân chia đôi về phía bụng. Các đốm màu nâu cam trên thân có xu hướng xếp thành hàng song song với các vạch sẫm màu, đặc điểm này thấy rõ ở cá nhỏ hơn cá lớn. Các đốm lớn màu nâu xám sẫm thường xuất hiện trên đầu, nổi bật ở sau mắt và trên nắp mang. Tùy vào môi trường sống, trạng thái sinh lý và giai đoạn phát triển màu sắc cơ thể có thể thay đổi [18].

Cá mú chấm cam tập trung chủ yếu ở các khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới chủ yếu ở khu vực biển có rạn san hô và bãi đá ngầm. Tại Việt Nam, cá mú chấm cam phân bố chủ yếu ở khu vực miền Trung và Nam Trung Bộ nơi có nhiều vịnh, rạn san hô và bãi đá ngầm. Cá mú chấm cam thuộc loài cá dữ, thức ăn chủ yếu là giáp xác, cá có kích thước nhỏ. Cơ thể trưởng thành của con cái dài 32 cm khi được 2 tuổi, con đực dài 24,2 cm khi được 1 tuổi. Khi chiều dài cơ thể ở 55 – 75 cm xảy ra quá trình chuyển đổi giới tính. Thời kì sinh sản chính từ tháng 3 đến tháng 6, tuy nhiên ở một số khu vực như New Caledonia ghi nhận các đợt sinh sản cuối tháng 10 đến đầu tháng 12, phía Nam vịnh Ba Tư từ tháng 3 đến tháng 5. Khả năng sinh sản từ 850.186 đến 2.904.912 trứng với kích thước cơ thể tương ứng 35 cm đến 62 cm. Cá mú chấm cam sinh trưởng và phát triển ở nhiệt độ lý tưởng 25 – 32°C, hoạt động



ăn uống giảm ở dưới 18°C và dừng ở dưới 15°C, với khả năng chịu mặn từ 14 – 40‰, thích hợp nhất là 20 – 30‰ [17].

### 1.1.2. Tình hình nghề nuôi cá mú

Nuôi trồng thủy sản ngày càng phát triển, trong đó, cá mú được xem là loài có giá trị kinh tế cao. Với đặc tính dinh dưỡng cao, cá mú được ưa chuộng trên thị trường Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc và một số nước châu Mỹ với giá lên tới 100 USD/kg. Theo thống kê của Pierre và cộng sự (2007), 90% thực phẩm trên thế giới có nguồn gốc từ biển và cá mú chiếm tỷ lệ lớn [19].

Trong những năm gần đây, sản lượng cá mú khai thác đang có xu hướng giảm do sản lượng nuôi đang dần tăng lên. Theo báo cáo của Cục thủy sản, năm 2023 tổng sản lượng thủy sản đạt 9.269 triệu tấn trong đó nuôi trồng thủy sản đạt hơn 5.408 triệu tấn (tăng 3,5% so với năm 2022), khai thác thủy sản đạt 3.861 triệu tấn [20]. Năm 1970, nghề nuôi cá mú được bắt đầu tại Malaysia, Hồng Kông, Đài Loan, Singapore và Thái Lan [21].

Tại Việt Nam, nghề nuôi cá mú bắt đầu từ năm 1988, tập trung ở Hải Phòng, Quảng Ninh, Vũng Tàu, Khánh Hòa. Nguồn cá mú giống chủ yếu từ tự nhiên được nuôi lồng trên biển. Hiện nay, sản lượng cá mú ước tính khoảng hơn 3.000 tấn/năm, có khoảng 7.000 lồng nuôi cá biển với hơn 80% lồng và khoảng 500 ao địa nuôi cá mú [22].

Tuy nhiên, nghề nuôi cá mú đang phải đối mặt với thách thức lớn về dịch bệnh gây ra như bệnh hoại tử thần kinh do virus Viral Nervous Necrosis gây ra với biểu hiện bơi xoay vòng, không định hướng, không có tổn thương bên ngoài và chết nhanh. Đặc biệt, bệnh xuất huyết lở loét và gan thận mũ do *Vibrio* gây ra là bệnh thường gặp nhất xuất hiện ở hầu hết các giai đoạn phát triển của cá mú nuôi, gây thiệt hại lớn ở nhiều nước. Các dấu hiệu đặc trưng: bơi lơ đờ, mất thăng bằng, xuất huyết quanh miệng, nhiều vết loét trên cơ thể . . . với tỷ lệ chết lên tới 70% quần đàn [23,24]. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có vaccine thương phẩm nào điều trị bệnh Vibriosis cho cá mú được cấp phép sử dụng mà biện pháp chủ yếu là sử dụng thuốc kháng sinh. Việc lạm dụng thuốc kháng sinh điều trị bệnh đã gây ra hiện tượng kháng kháng sinh. Shyne và cộng sự (2008) đã nghiên cứu khả năng kháng kháng sinh của *V. parahaemolyticus* phân lập từ cá mú bệnh cho thấy tỷ lệ nhạy cảm khá cao với kháng sinh chloramphenicol (89%), streptomycin và acid nalidixic (67%), neomycin (44%), kháng với hầu hết các kháng sinh còn lại [25]. Tương tự, Robles và cộng sự khi đánh giá khả năng kháng kháng sinh của *V. alginolyticus* phân lập từ hầu hết kết quả thấy 90% chúng kháng kháng sinh nhóm Beta-lactam, 60% kháng cephalotin, 45% kháng amikacin, 16% kháng cephotaxime và 10% kháng

pefloxacin [26]. Ngoài ra, dư lượng kháng sinh tồn dư trong nước nuôi và sản phẩm thủy sản còn gây ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng. Vì vậy, nghiên cứu tạo vaccine phòng bệnh là giải pháp an toàn và mang tính phát triển bền vững.

## 1.2. TỔNG QUAN VỀ VI KHUẨN *Vibrio* spp.

*Vibrio* thuộc nhóm vi khuẩn gram âm, có dạng cong – que (dấu phẩy), sống phổ biến ở môi trường của sông ven biển [27]. Theo khóa phân loại của Bergey, vi khuẩn *Vibrio* thuộc [28]:

Ngành: Proteobacteria

Lớp: Gramma Proteobacteria

Bộ: Vibrionales

Họ: Vibrionaceae

Chi: *Vibrio*

Một số loài vi khuẩn gây bệnh phổ biến cho các động vật thủy sản thuộc chi *Vibrio* spp. bao gồm *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus* . . . Chúng đều là những mầm bệnh liên quan đến nhiễm trùng huyết, hoại tử gan thận, bệnh tả, bệnh lở loét... với tỷ lệ gây chết trên thủy sản lên tới 90%. Một số chủng vi khuẩn có thể gây bệnh cho người.

### 1.2.1. *Vibrio parahaemolyticus*

#### 1.2.1.1. Đặc điểm hình thái, hóa sinh và sinh trưởng

*V. parahaemolyticus* là một trong những tác nhân gây bệnh chính cho động vật thủy sản, xuất hiện nhiều ở môi trường nước biển và được phân lập từ mẫu cá bệnh của các loài: cá tuyết, cá xacdin, cá thu, cá bơn, . . . [29]. Vi khuẩn này thường sống ở các cửa sông và ven biển của hầu hết các vùng biển trên thế giới, được phân lập từ cát, bùn và nước biển, cũng như ở thủy sản bệnh. Vi khuẩn này được Fujino phát hiện lần đầu tiên vào năm 1950 như một tác nhân gây bệnh truyền qua thực phẩm sau một đợt bùng phát lớn ở Nhật Bản ghi nhận 272 ca với 20 ca tử vong sau khi ăn shirasu [30]. Trên môi trường TCB, khuẩn lạc của *V. parahaemolyticus* lớn, có đường kính 3 – 4mm, có màu xanh [31]. Tuy nhiên, khi sử dụng môi trường TCBS *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* hay *V. mimicus* đều có màu xanh nên sẽ không phân biệt được hai chủng [32]. Vì thế, người ta phân loại huyết thanh để nhận biết *V. parahaemolyticus* kháng nguyên soma (O) và capsular (K) [33].

Các đặc trưng sinh hóa của *V. parahaemolyticus* thể hiện trong bảng 1.1. *V. parahaemolyticus* có thể tăng trưởng tốt trong môi trường có muối 8%, bị ức chế trong môi trường muối có nồng độ 10% [20]. Trên môi trường thạch máu, *V. parahaemolyticus* sinh ra độc tố haemolysin phá hủy hồng cầu hiện gây hiện tượng tan huyết [34].

**Bảng 1.1.** Đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* [31]

Các phản ứng sinh hóa	<i>V. parahaemolyticus</i>
Catalase	+
Oxidase	+
Beta – galactosidase	-
Agrinine	-
Lysine decarboxylase	+
Ornithine decarboxylase	-
Citrate	-
H <sub>2</sub> S	-
Urease	-
Tryptophane deminase	-
Indole	+
Phản ứng Voges – Proskauer	+
Gelatinase	+
Glucose	+
Manitol	+
Inositol	-
Sorbitol	-
Rhamnose	-
Sucrose	-
Melibiose	-
Amygdalin	+
Arabinose	-
Lactose	-

Ghi chú: (+) dương tính, (-) âm tính

Nhiệt độ môi trường nước có mối liên hệ chặt chẽ đến sự phân bố của *V. parahaemolyticus*. Khi nước ở nhiệt độ 14 – 15° C mật độ *V. parahaemolyticus* rất thấp và khó phát hiện nhưng khi nhiệt độ tăng lên 18° – 19° C thì số lượng vi khuẩn tăng lên rõ rệt trong môi trường nước và có thể phát hiện được [35]. *V.*

*parahaemolyticus* có thể sinh trưởng trong khoảng 5° C đến 44° C, pH từ 4,8 đến 11,0. Sự phát triển tối ưu ở 35° C đến 37° C, 3% NaCl và pH từ 7,6 đến 8,6 [36].

*V. parahaemolyticus* là tác nhân gây bệnh chính gây bệnh cho nhiều loài động vật thủy sản trong đó phải kể đến cá ở Châu Á [37]. Ngoài ra, vi khuẩn này cũng gây nhiễm trùng đường tiêu hóa và các biến chứng sức khỏe khác, có thể đe dọa đến tính mạng con người, làm suy giảm hệ miễn dịch ở người [38].

### **1.2.1.2. Hệ gene của vi khuẩn *V. parahaemolyticus***

Phân tích hệ gene của *V. parahaemolyticus* FORC\_008 Kim và cộng sự (2016) đã ghi nhận hệ gene gồm hai nhiễm sắc thể dạng vòng, không có plasmid. Nhiễm sắc thể I có kích thước 3.266.132 bp với hàm lượng G + C trung bình là 45,36%, 115 gene tRNA, 28 gene rRNA và chứa 2.909 ORF trong đó 2.513 ORF (86,39%) mã hóa protein chức năng, 539 ORF là protein giả định. Nhiễm sắc thể II có kích thước 1.772.036 bp với hàm lượng G + C trung bình là 45,53%, chứa 14 gene tRNA, 3 gene rRNA và 1.585 ORF trong đó 1.245 ORF (78,55%) mã hóa protein chức năng, 340 ORF là protein giả định [39].

Năm 2016, Letchumanan và cộng sự đã công bố trình tự hệ gene vi khuẩn *V. parahaemolyticus* VP512 phân lập từ *Penaeus indicus* ở Malaysia. Theo đó hệ gene của chủng VP512 có kích thước 4.982.021 bp, hàm lượng G + C trung bình là 53,4%. Hệ gene chứa 11 gene rRNA, 80 genr tRNA và 4.809 ORF trong đó 4.638 ORF mã hóa protein chức năng, 171 ORF là protein giả định [40].

### **1.2.1.3. Đặc điểm kháng nguyên của vi khuẩn *V. parahaemolyticus***

Dựa trên 13 loại kháng nguyên soma (O) bền nhiệt lypopolysaccharide (LPS) và 71 loại kháng nguyên polysaccharide dạng nang (K) để phân loại *V. parahaemolyticus* [41,42]. Hiện nay, *V. parahaemolyticus* mặc dù không có mối tương quan rõ ràng giữa các kiểu huyết thanh và cơ chế gây bệnh, nhưng một số dòng huyết thanh được xác định là có độc tố cao gây ra các vụ đại dịch. Shyne và cộng sự (2016) khi nghiên cứu 9 chủng *V. parahaemolyticus* phân lập từ cá song điểm gai và cá mú chấm cam phát hiện 1 kháng nguyên bề mặt với kích thước phân tử 34 kDa [43]. Tương tự, Li và cộng sự (2014) đã phát hiện 8 protein màng ngoài của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được cho là có khả năng tạo đáp ứng miễn dịch cho cá bao gồm OmpK, OmpA, OmpU, LptD, LamB, VP0802, VP1243 và Vp0966 [44]. LptD là một kháng nguyên tiềm năng trong việc phát triển vaccine phòng bệnh do *Vibrio* gây ra [44]. Cấu trúc phân tử LptD được xây dựng với 26 nếp gấp  $\beta$  cùng 6 protein khác nhau LptA, B, C, E, F và G tạo thành một phức hợp trên màng tế bào

[45]. LptD là một kháng nguyên tiềm năng trong việc phát triển vaccine phòng bệnh do *Vibrio* gây ra [46].

### 1.2.2. *Vibrio alginolyticus*

#### 1.2.2.1. Đặc điểm hình thái, hóa sinh và sinh trưởng

Tương tự như *V. parahaemolyticus* thì *V. alginolyticus* cũng là một vi khuẩn ưa mặn, sống phổ biến ở ven cửa sông và ven biển, phát triển mạnh vào mùa hè [47]. Trong một đợt khảo sát tại Hàn Quốc từ năm 2005 đến năm 2007, tác giả đã phân lập được 218 chủng *V. parahaemolyticus* và 153 chủng *V. alginolyticus* từ 180 mẫu cá thu thập được tại các trang trại nuôi cá dọc theo bờ biển phía nam Hàn Quốc [48]. Một số nghiên cứu cũng chỉ ra rằng *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus* có môi trường sống tương tự nhau và có thể phân lập từ những loại mẫu như nhau. Molitoris và cộng sự đã tiến hành phân lập được 567 chủng *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus* từ nước biển và các loại hải sản ở chợ Jakarta ở Indonesia [49].

Đặc điểm sinh hóa là một trong những tiêu chí quan trọng để định danh một loài vi khuẩn. Ngoài ra, *V. alginolyticus* dương tính với lysin, nitrate, glucose, mannitol, sucrose, lipid, gelatin, oxidase, indole, có khả năng di động nhưng âm tính với ure, arginine, lactose, salicin và H<sub>2</sub>S (bảng 1.2). *V. alginolyticus* không phát triển trong môi trường không có muối NaCl nhưng phát triển tốt ở 37°C với 7% NaCl [50].

**Bảng 1.2.** Đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn *V. alginolyticus* [50]

Các đặc điểm sinh hóa	<i>V. alginolyticus</i>
Catalase	+
Beta-galactopyranosidase	-
Arginine dihydrolase	-
Lysine decarboxylase	+
Ornithine decarboxylase	-
Urease	-
Tryptophane deminase	-
Gelatinase	+
H <sub>2</sub> S	-
Indole	+
Citrate	-

Glucose	+
Mannitol	+
Sucrose	+
Motility	+
Khử nitrate	+
Indole	+
Oxidase	-
Arabinose	-
Rhamnose	-
Melibiose	-
Amygdalin	-

*Ghi chú: (+) dương tính, (-) âm tính*

Theo nghiên cứu của Ulitzur (1974). nhiệt độ, nồng độ muối có ảnh hưởng lớn đến tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn *Vibrio*. Ở 21°C, tốc độ sinh trưởng giữa các thế hệ là 60 phút, ở 39°C là 10 – 11 phút [51]. Tương tự, Farid và cộng sự (1981) đã nghiên cứu sự phát triển của năm chủng *V. alginolyticus* trên môi trường Trypticase Soy Broth với các nồng độ NaCl (0,5; 3; 6%). Kết quả cho thấy tốc độ tăng trưởng thuận lợi nhất ở nồng độ NaCl 3%, tốc độ tăng trưởng thấp nhất ở NaCl 0,5% [52]. Gjerde và Boe (1981) khi phân tích các mẫu từ bờ biển Na Uy thấy rằng tỷ lệ *V. alginolyticus* tăng vào tháng 6 đến tháng 9 khi nhiệt độ nước 10° – 16° C [53].

#### **1.2.2.2. Hệ gene của vi khuẩn *Vibrio alginolyticus***

Nhiều nhóm nghiên cứu đã giải và phân tích hệ gene của *V. alginolyticus*. Chibani và cộng sự (2020) đã báo cáo hệ gene của *V. alginolyticus* gồm 2 nhiễm sắc thể, trong đó nhiễm sắc thể 1 dài 3,47 Mbp và nhiễm sắc thể 2 dài 1,88 Mbp, với hàm lượng % GC khoảng 44% [54].

Phân tích hệ gene của vi khuẩn *V. alginolyticus* ZJ-T, Deng và cộng sự (2016) đã ghi nhận hai nhiễm sắc thể dạng vòng có tổng kích thước là 5.406.095 bp với tỷ lệ G+C là 44,71% với 4.866 gene bao gồm 4.664 gene mã hóa, 46 pseudogene, 28 rRNA, 124 tRNA và 4 gene không mã hóa [55].

Wang và cộng sự (2016) đã báo cáo hệ gene của vi khuẩn *V. alginolyticus* ATCC 33787<sup>T</sup> với hai nhiễm sắc thể dạng vòng và ba plasmid. Nhiễm sắc thể 1 có kích thước 3.362.673 bp, 44,7% G+C; nhiễm sắc thể 2 có kích thước 1.851.538 bp, tỷ lệ G+C 44,3% và ba plasmid: pMBL128 (128.112 bp, 44,3% G+C); pMBL287

(286.750 bp, 41.4% G+C); pMBL96 (95.866 bp, 46,0% G+C); mã hóa 125 tRNA và 34 rRNA [56].

### 1.2.2.3. Đặc điểm kháng nguyên của vi khuẩn *V. alginolyticus*

Ở vi khuẩn gram âm, thành tế bào có một lớp peptidoglycan được bao quanh bởi một cấu trúc màng gọi là màng ngoài (Outer membrane OM). Màng ngoài (OM) của vi khuẩn gram âm rất quan trọng để thiết lập sự kết dính ban đầu, điều chỉnh sự tương tác giữa vật chủ và mầm bệnh. Màng ngoài của *Vibrio* chứa lipopolysaccharide (LPS), protein màng ngoài và phospholipid [57,58]. Cai và cộng sự (2010) cho rằng các protein màng ngoài (Omp) đóng vai trò quan trọng trong độc lực của vi khuẩn và là ứng cử viên tiềm năng trong sản xuất vaccine [15].

Năm 2022, Ganie và cs đã nghiên cứu cấu trúc, sự điều hòa và sự tương tác giữa OmpU của loài *Vibrio* với tế bào vật chủ cho thấy OmpU là protein màng ngoài chọn lọc cation. OmpU phân lập từ các loài *Vibrio* tạo ra phản ứng miễn dịch ở một số vật chủ nuôi trồng thủy sản. Tác giả cho rằng, OmpU là một protein bám dính và là yếu tố độc lực quan trọng để các loài *Vibrio* xâm nhập thành công vào tế bào vật chủ [59]. Tương tự, Tengeng và cộng sự (2020) đã khuếch đại trình tự gene *OmpK* của *V. alginolyticus* có kích thước 1023 bp mã hóa 340 aa, kích thước phân tử ước tính 37,2 kDa. Phân tích, so sánh trình tự bằng phần mềm BLAST chỉ ra rằng trình tự nucleotide của *OmpU* có mức độ tương đồng 84%, 84%, 85%, 90%, 92% với *OmpU* của *V. splendidus* (CP003241.1), *V. harveyi* (CP009467.2), *V. natriegens* (CP016351.1), *V. parahaemolyticus* (CP006004.1), *V. antiquarius* (CP001805.1) [60]. Cai và cộng sự (2020) nghiên cứu khả năng tạo đáp ứng miễn dịch của protein OmpU với *V. alginolyticus* trên *Lutjanus erythropterus* thấy rằng OmpU là một ứng viên tiềm năng để phát triển vaccine chống lại *V. alginolyticus* cho *L. erythropterus*, với kích thước protein khoảng 35,6 kDa, có tính tương đồng cao với OmpU của các loài *Vibrio* khác cụ thể: *V. harveyi* HY01 (GenBank no. ZP\_01987812) 92%, *V. parahaemolyticus* AQ3810 (GenBank no. ZP\_01990045) 88%, *V. alginolyticus* 12G01 (GenBank no. ZP\_01262703) 88%, *V. campbellii* AND4 (GenBank no. ZP\_02195095, 88 %) và *V. vulnificus* CMCP6 (GenBank no. NP\_762536) 81% [15].

Li và cộng sự (2010) đã phân tích các gene *OmpK* của các loài *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis* và *V. mimicu*, kết quả nghiên cứu cho thấy gene có 798 đến 822 nucleotide mã hóa 266 đến 274 amino acid. Kháng thể đa dòng chống lại OmpK *V. alginolyticus* được phát triển ở chuột và phản ứng dương tính với từng loài trong số 5 loài *Vibrio* spp thử nghiệm. Nhưng

kháng thể này lại âm tính với 18 chủng vi khuẩn gram âm khác. Có thể thấy OmpK là một kháng nguyên đặc hiệu để phát triển vaccine [61]. Trước đó, Quian và cộng sự (2008) đã nghiên cứu biểu hiện và tinh sạch hai protein màng ngoài của *V. alginolyticus* là OmpK và OmpW. Kết quả cho thấy gene *OmpK* với kích thước 846 bp mã hóa 281 amino acid, với trọng lượng phân tử khoảng 31,3 kDa. Khi so sánh trình tự amino acid của *V. alginolyticus* trên NCBI cho thấy có sự tương đồng cao với *V. parahemolyticus* (81,2%), *V. harveyi* (78,1%), *V. vulnificus* (75,2%), và *V. cholerae* (73,7%) [62].

### **1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VACCINE PHÒNG BỆNH DO *Vibrio spp.* GÂY RA**

#### **1.3.1. Trên thế giới**

##### **1.3.1.1. Vaccine tái tổ hợp**

Protein màng ngoài là một trong những kháng nguyên bề mặt được đánh giá cao trong phát triển vaccine phòng bệnh do *Vibrio spp.* gây ra. Hướng nghiên cứu chủ yếu là tạo vaccine tái tổ hợp mang gene kháng nguyên hoặc vaccine DNA tiêm vào cơ thể cá để kích thích tạo đáp ứng miễn dịch bảo hộ cho cá. Silvaraj và cộng sự (2020) đã tiến hành nghiên cứu hiệu quả của 2 loại vaccine tái tổ hợp có chứa OmpK của *V. alginolyticus* và r-DnaJ của *V. harveyi*. Kết quả cho thấy r-OmpK và r-DnaJ đều kích hoạt khả năng bảo vệ bằng cách giảm sự viêm và tăng cường hệ miễn dịch. Cá được tiêm vaccine cũng cho thấy khả năng bảo vệ chéo chống lại các chủng *Vibrio* khác nhau. Tỷ lệ bảo hộ (RPS) với cá được tiêm vaccine r-OmpK là 90% đối với *V. harveyi* và 100% đối với *V. alginolyticus* và *V. parahaemolyticus* [63].

Li và cộng sự (2010) đã nghiên cứu gene *OmpK* từ 19 chủng *Vibrio* bao gồm 11 chủng *V. harveyi*, 6 chủng *V. alginolyticus*, 2 chủng *V. parahaemolyticus*, kết quả phân tích các trình tự amino acid từ chủng *V. harveyi* EcGA020802 có tỷ lệ đồng nhất với OmpK của *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* từ 71,7% đến 99,2%, kích thước protein trong khoảng 28 đến 31 kDa. Bên cạnh đó, tỷ lệ bảo hộ chéo của OmpK tái tổ hợp được đánh giá thông qua các chủng *Vibrio* có độc lực không đồng nhất ở cá mú chấm cam. Kết quả cho thấy cá mú chấm cam được tiêm phòng OmpK tái tổ hợp có khả năng miễn dịch cao hơn. Đây là một kháng nguyên tiềm năng trong phát triển vaccine điều trị bệnh do *Vibrio* gây ra [64].

Tương tự, Lun và cộng sự (2016), đã phân tích gene *OmpU* từ 10 chủng *Vibrio* để xác định đặc điểm phản ứng miễn dịch chéo cho thấy sự tương đồng của



OmpU dao động từ 73 – 100% trong cùng một loài, 58,6 – 89% giữa các loài. Tỷ lệ bảo hộ được ghi nhận trong khoảng 43 – 100%. OmpU là một kháng nguyên được bảo tồn trong số các loài *Vibrio* được thử nghiệm [65].

### 1.3.1.2. Một số loại vaccine khác

Năm 2023, D F. và cộng sự đã tạo vaccine  $\Delta$  fliR bằng cách knock-out gene *fliR* sử dụng làm vaccine sống giảm độc lực gây miễn dịch cho cá mú. Kết quả cho thấy, gene *fliR* có kích thước 783 bp, mã hóa 260 amino acid, với tỷ lệ bảo hộ là 67,2% chống lại *V. alginolyticus* ở cá mú [66]. Chen và cộng sự (2019) đã knock-out gene *acfA* tạo chủng đột biến giảm độc lực  $\Delta$ acfA có khả năng chống lại chủng *V. Alginolyticus* HY9901 gây bệnh trên cá mú ngọc trai với tỷ lệ bảo hộ cao (81,1%) [67]. Tương tự, Zhou và cộng sự (2020) đã chọn lọc knock-out gene trong hệ thống T3SS (Type III secretion system) để tạo chủng vi khuẩn giảm độc lực. Tỷ lệ bảo hộ của vaccine chống lại *V. alginolyticus* HY9901 ở cá ngựa vằn đạt 71,2% [68]. Nhược điểm của vaccine nhược độc là khó bảo quản và tính an toàn chưa cao.

Aly và cộng sự (2021) đã đánh giá hiệu quả bảo hộ của vaccine đa giá chứa vi khuẩn bất hoạt *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus*. Tỷ lệ bảo hộ (RPS) trên cá *Sparus aurata* đối với vaccine bất hoạt chứa *V. parahaemolyticus* O11:K40 và *V. alginolyticus* là 91,75%, đối với vaccine bất hoạt chứa *V. parahaemolyticus* O3:O6 và *V. alginolyticus* là 75% [69]. Năm 2023, Mahmoud và cộng sự đã đánh giá tỉ lệ bảo hộ vaccine bất hoạt từ hai chủng *V. alginolyticus* và *S. agalactiae* có kết hợp tá được Freund's và Montanide™ IMS 1312 VG. Tỷ lệ bảo hộ (RPS) của cá được tiêm vaccine bổ trợ Montanide™ IMS 1312 VG sau khi nhiễm *V. alginolyticus* là 80%, 95%, 90%, 85%, 75% và 60% tương ứng với các tuần 2, 4, 6, 8, 12, 14 tuần. Đối với vaccine bổ trợ Freund's tỷ lệ bảo hộ của cá sau khi thử thách với *V. alginolyticus* là 75%, 90%, 85%, 85%, 70%, 60% và 45% [70]. Vaccine bất hoạt có tỷ lệ bảo hộ khá cao nhưng nhược điểm là thời gian bảo hộ ngắn.

Peng và cộng sự (2021) đã chọn ngẫu nhiên 16 protein trong 69 protein ngoại bào để tạo vaccine DNA gây miễn dịch cho cá ngựa vằn. Trong số 16 loại vaccine DNA có 3 loại AT730\_21605, AT730\_22220 và AT730\_22910 cho tỷ lệ bảo hộ chống lại *V. alginolyticus* lần lượt là 66,7%; 50% và 47%. Ngoài ra, AT730\_22220, AT730\_22910 và AT730\_21605 cũng thể hiện khả năng bảo hộ chéo, là ứng viên tiềm năng phát triển vaccine đa giá [71].

### 1.3.2. Tại Việt Nam

#### 1.3.2.1. Vaccine tái tổ hợp

Ở Việt Nam, vi khuẩn *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus* gây thiệt hại rất nhiều cho ngành thủy sản nói chung và ngành nuôi cá biển nói riêng nhưng những nghiên cứu tạo vaccine phòng bệnh do 2 loài vi khuẩn này gây ra còn khá mới ở nước ta đặc biệt là nghiên cứu tạo vaccine tái tổ hợp. Hiện chưa có vaccine tái tổ hợp phòng bệnh do *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus* gây cho cá mú nói riêng và cá biển nói chung được phát triển tại Việt Nam.

#### 1.3.2.2. Một số loại vaccine khác

Thùy và cộng sự (2013) đã tạo vaccine bất hoạt phòng bệnh trên cá mú chấm cam do *V. parahaemolyticus* gây ra. Chủng *V. parahaemolyticus* V3 phân lập từ cá mú nhiễm bệnh được nuôi cấy trên môi trường TSB bổ sung 2% NaCl, 33°C, 24 giờ sau đó được bất hoạt bằng formalin 0,5% trong 24 giờ ở 4°C. Vi khuẩn sau khi bất hoạt được rửa lại với PBS 3 lần và pha loãng với mật độ  $10^9$  CFU/ml, sau đó kết hợp với chất bổ trợ FIA với tỷ lệ 1 : 1. Đánh giá tỷ lệ bảo hộ sau 30 ngày tiêm đạt 87,5% khi kết hợp chất bổ trợ và 50% khi không kết hợp chất bổ trợ, sau 60 ngày tỷ lệ bảo hộ tương ứng là 41,1% và 10,9%. Vaccine bất hoạt có tỷ lệ bảo hộ khá tốt tuy nhiên thời gian bảo hộ lại khá ngắn [72].

Huyền và cộng sự (2020) đã xử lý 3 chủng *V. parahaemolyticus* bằng rifampicin và chọn lọc được 8 chủng đột biến giảm độc lực. Trong đó, dòng *V. parahaemolyticus* L4650 tạo đáp ứng miễn dịch cho cá mú chấm cam với tỷ lệ bảo hộ (RPS) từ 96,91 – 100% sau 15 ngày tiêm và 96,27 – 100% sau 60 ngày tiêm [73].

Mặc dù có nhiều nghiên cứu về vaccine phòng bệnh Vibriosis gây ra nhưng rất ít vaccine được thương mại hóa. Hiện nay, các nghiên cứu đang hướng đến vaccine tái tổ hợp sử dụng protein màng ngoài. Trong đó, OmpK và OmpU được đánh giá là ứng viên tiềm năng cho việc phát triển vaccine phòng bệnh do *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus* gây ra.

## 1.4. HỆ THỐNG DÙNG ĐỂ BIỂU HIỆN GENE KHÁNG NGUYÊN

### 1.4.1. Hệ thống biểu hiện *E. coli*

*E. coli* là vi khuẩn Gram âm, hình que, không có nội bào tử, thuộc chi *Escherichia*. Chúng có tốc độ sinh trưởng nhanh, trung bình 22 phút nhân bản một lần. Đặc biệt, ở *E. coli* hai quá trình phiên mã và dịch mã luôn đi song song với nhau. Sau phiên mã các sợi RNA thông tin sẽ được dịch mã thành protein và không

trải qua quá trình sửa chữa sau dịch mã. Đặc tính di truyền của *E. coli* đã được nghiên cứu kỹ lưỡng. Ưu điểm của hệ thống biểu hiện *E. coli* là rất dễ thực hiện, hệ thống lên men không phức tạp, không đòi hỏi trang thiết bị, vật tư, môi trường nuôi cấy đắt tiền. Chính vì vậy, *E. coli* thường được chọn làm vật chủ trong việc tạo ra protein dị loài, sản xuất protein tái tổ hợp [55].

*E. coli* BL21 (DE3) là chủng mang gene mã hóa cho T7 RNA polymerase (chịu sự kiểm soát của Lac operator), có ưu thế trong việc biểu hiện gene của DNA plasmid có mang gene đích được điều khiển bởi promoter T7. Các gene điều khiển bởi promoter T7 được phiên mã với hiệu quả cao. Đồng thời, *E. coli* BL21 (DE3) là chủng mang đột biến gene *rne* (gene mã hóa Rnase E) làm mất khả năng tổng hợp Lon protease (protease nội bào) và OmpT protease (protease màng ngoài tế bào) giúp ổn định protein ngoại lai trong tế bào sau khi tổng hợp. Để biểu hiện protein tái tổ hợp trong *E. coli*, nhiều hệ vector plasmid được phát triển trong đó có hệ thống vector pET. Gene ngoại lai cần biểu hiện trong vector pET được thiết kế chịu sự kiểm soát của T7 promoter và lac operator, gene này chỉ hoạt động khi có mặt chất cảm ứng như IPTG.

#### 1.4.2. Vector biểu hiện pET28a(+)

Vector pET28a(+) có kích thước 5369 bp, được sử dụng với mục đích chính là biểu hiện gene ngoại lai. Trên vector pET28a(+) có vùng Lac Operator và T7 promoter là vị trí gắn và nhận biết của gene điều hòa giúp cho quá trình điều hòa hoạt động của gene. T7 RNA polymerase là một enzyme trong tế bào vật chủ, hoạt động mạnh, có tính chọn lọc cao. Đồng thời, khi kích hoạt enzyme này chỉ sau vài giờ, sản phẩm protein tái tổ hợp được biểu hiện chiếm hơn 50% protein tổng số. Ngoài ra, vector pET28a(+) cũng mang gene kháng kháng sinh kanamycine giúp cho việc duy trì và chọn lọc các plasmid trong tế bào vi khuẩn. Đoạn 6xHis trên vector có thể giúp cho quá trình tinh sạch protein bằng cột sắc ký ái lực.

Như vậy, vector pET28a(+) mang đầy đủ yêu cầu của một vector biểu hiện: trình tự promoter mạnh có tính ái lực cao với ARN polymerase, có thể kiểm soát và tăng cường mức độ phiên mã của gene đích cần biểu hiện nhân dòng. Trong đề tài nghiên cứu này tôi sử dụng vector pET28a(+) để biểu hiện đoạn gene kháng nguyên *OmpK* và *OmpU*.

## Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI VÀ VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

#### 2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Cá mú, chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*.

#### 2.1.2. Phạm vi nghiên cứu

Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* được phân lập từ mô mẫu động vật và nước nuôi thủy sản tại một số tỉnh ven biển miền Bắc Việt Nam.

#### 2.1.3. Vật liệu nghiên cứu

Cá mú chấm cam (*Epinephelus coioides*) có chiều dài từ 9 – 10 cm (10 - 12 g) được cung cấp từ Trung tâm Giống thủy sản (Hải Phòng).

Vi khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$  và *E. coli* (BL21) do phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, Đại học Sư phạm Hà Nội cung cấp.

Vector nhân dòng pGEM-T-easy (Promega), pCE2 TA/Blunt-Zero (Vazyme), plasmid pET28a(+) do phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, Đại học Sư phạm Hà Nội và phòng Vi sinh vật học phân tử, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

#### 2.1.4. Hóa chất

##### 2.1.4.1. Hóa chất nuôi cấy vi khuẩn

Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS) agar (Himedia, Ấn Độ): Yeast extract 5 g/L, Peptone 15 g/L, Sodium citrate 10 g/L, Sodium thiosulfate 10 g/L, Sodium chloride 10 g/L, Bile 3 g/L, Sucrose 20 g/L, Sodium cholate 5 g/L, Ferric citrate 1 g/L, Bromo thymol blue 0,04 g/L, Thymol blue 0,04 g/L, Agar 15 g/L

Luria Bertani Broth (LB Broth) (Himedia, Ấn Độ): Tryptone 10 g/L, Yeast extract 5 g/L, Sodium chloride 10 g/L, pH 7.5 $\pm$ 0.2 (25°C)

Luria Bertani Agar (LB Agar) (Himedia, Ấn Độ): Tryptone 10 g/L, Yeast extract 5 g/L, Sodium chloride 10 g/L, Agar 15 g/L, pH 7.5 $\pm$ 0.2 (25°C)

Chromagar<sup>TM</sup> Vibrio: Agar 15 g/L, Peptone & Yeast extract 8 g/L, Salts 51,4 g/L, Chromogenic mix 0,3 g/L, pH 9.0 $\pm$ 0.2

##### 2.1.4.2. Hóa chất sử dụng để xác định hình thái, đặc điểm sinh hóa và khả năng kháng kháng sinh

Hóa chất nhuộm Gram (National Industry and Scientific Company, Việt Nam)

Hóa chất đánh giá đặc điểm sinh hóa: Kligler Iron Agar - KIA (HiMedia Laboratories, Ấn Độ); Tryptophan Broth (Merck, Đức); dung dịch thuốc thử Kovac's (Merck, Đức); Luria Bertani Broth - LB Broth (HiMedia Laboratories, Ấn Độ); dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%; môi trường thạch máu - Blood Agar (Merck, Đức).

Đĩa giấy tẩm kháng sinh của hãng Mast Diagnostics (Anh) với đường kính 6 mm bao gồm: ampicillin 25 µg (AM25), amoxicillin 10 µg (AML10), doxycycline 30 µg (DO30), oxytetracycline 30 µg (OTC30), ceftiofur 30 µg (EFT30), streptomycin 10 µg (S10), amikacin 30 µg (AK30), chloramphenicol 30 µg (C30), florfenicol 30 µg (FFC30), rifampicin 10 µg (RA10), aztreonam 30 µg (ATM30), enrofloxacin 5 µg (ENR5), ciprofloxacin 5 µg (CIP5) dùng trong thí nghiệm đánh giá khả năng kháng kháng sinh của các chủng *Vibrio* phân lập được.

#### **2.1.4.3. Hóa chất dùng trong sinh học phân tử**

Tách chiết DNA và tinh sạch: G-spin™ Total DNA Extraction Mini Kit (Intron, Hàn Quốc), kit DNA-spin™ Plasmid DNA Purification (iNtRON, Hàn Quốc), MEGAquick-spin™ Plus Total Fragment DNA Purification kit (Intron, Hàn Quốc).

PCR và điện di: Master mix 2X (Phusa, Việt Nam), mỗi PCR (Phù Sa Genomic, Việt Nam), 50X TAE Buffer (Thermo Scientific, Canada), agarose (Bio Basic, Canada), DNA Ladder 10kb (Bioline, Đức), ethidium bromide (Thermo Scientific, Canada), Loading dye 10X (Neb, Hàn Quốc).

Tách dòng và biểu hiện gene: enzyme cắt giới hạn BamHI và HindIII (Thermo Scientific, Mỹ), enzyme nối T4 ligase (Thermo Scientific, Canada), pGem®-T Vector Systems (Promega, Mỹ), Topo TA/Blunt-Zero Cloning kit C601 (Vazyme, Trung Quốc), kháng sinh ampicillin và kanamycin (Serva, Đức), Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Sigma, Anh).

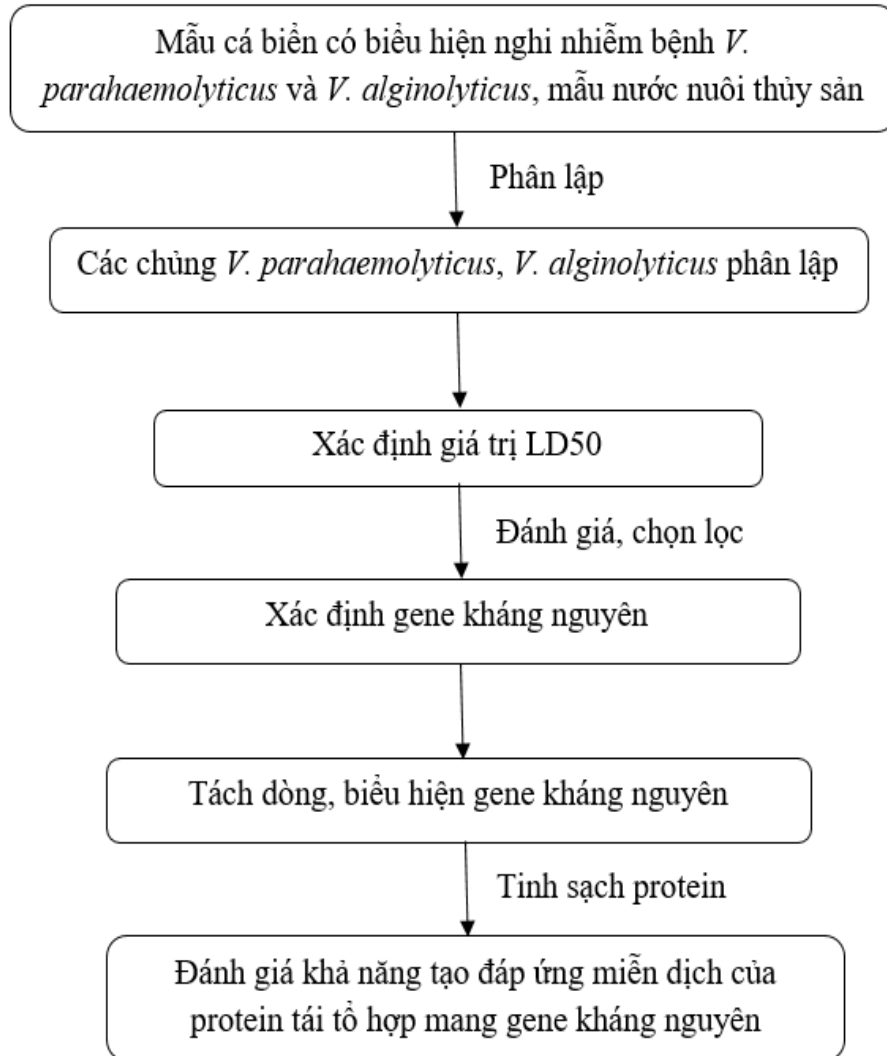
Tinh sạch protein: Ni-NTA agarose (Promega, Mỹ), imidazole (Biobasic, Canada), KCl, β-mercaptoethanol, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, glycerol, KCl, Sodium Dodecyl Sulfate, Tris-HCl, nước khử ion, Protein marker 250 kDa (Biobasic, Canada).

#### **2.1.5. Thiết bị**

Thiết bị sử dụng trong nghiên cứu: Máy ly tâm Eppendorf 5415R (Eppendorf, Đức), máy li tâm Universal 320R (Hettich, Đức), cột sắc ký, máy PCR Mastercycler® nexus X2 (Eppendorf, Mỹ), Máy spin-down Dlab (Dlab, Mỹ), máy Vortex (Mimishaker, IKA, Đức), máy biến nạp Gene Pulser Xcell™ (Bio-rad, Mỹ), máy phá tế bào (taisite, Trung Quốc), máy đo OD Epoch 2 (Biotek, Mỹ), máy chạy

điện di (Bio-rad, Mỹ) cùng với các trang thiết bị khác của phòng Di truyền - Hóa sinh, khoa Sinh học, trường Đại học Sư phạm Hà Nội và phòng Vi sinh vật học phân tử, viện Công nghệ Sinh học, viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

## 2.2. SƠ ĐỒ THỰC HIỆN THÍ NGHIỆM



## 2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.3.1. Phương pháp phân lập các chủng vi khuẩn *Vibrio* spp. từ mẫu cá bệnh và nước nuôi thủy sản

- *Phương pháp thu mẫu và phân lập vi khuẩn từ môi trường nước nuôi thủy sản*: Phân lập các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus* từ nước nuôi trồng thủy sản được tiến hành theo theo Alipour và cộng sự [74]. Mẫu nước được thu thập tại 5 tỉnh ven biển khu vực phía Bắc Việt Nam. Tại mỗi khu vực lấy mẫu, nước được thu tại năm vị trí khác nhau, mỗi khu vực cách mặt nước 20 – 30

cm và đựng trong ống ficol 50 ml đã khử trùng. Tiến hành phân lập mẫu nước trong 24 giờ thu mẫu. Mẫu được pha loãng nồng độ thích hợp và cấy trải 100 – 150 µl dung dịch mẫu đã pha loãng trên môi trường TCBS agar Chromager™ Vibrio.

- *Phương pháp phân lập vi khuẩn từ mẫu cá bệnh*: Mẫu cá bệnh được xác định theo miêu tả của Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (U.S. Food and Drug Administration) [75]. Phân lập *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus* được thực hiện như sau: gan, thận, vây, da được nghiền nhỏ trong dung dịch NaCl 1,5%, sau đó vortex thu dung dịch huyền phù, pha loãng với nồng độ thích hợp và cấy trải trên môi trường TCBS agar và Chromager™ Vibrio.

Chọn lọc khuẩn lạc, phân tích hình thái và đánh giá các đặc điểm sinh hóa của các mẫu vi khuẩn. Các mẫu vi khuẩn phân lập được định danh bằng trình tự 16S rRNA [76].

### **2.3.2. Phương pháp nhuộm Gram, đánh giá chỉ tiêu sinh hóa và tính kháng kháng sinh của vi khuẩn**

#### **2.3.2.1. Phương pháp nhuộm Gram**

Phương pháp nhuộm gram được thực hiện theo phương pháp của Hucker (1927) [77] sử dụng bộ nhuộm Gram Strains - Kit (Himedia, Ấn Độ).

#### **2.3.2.2. Phương pháp đánh giá chỉ tiêu sinh hóa**

Các chỉ tiêu sinh hóa được đánh giá theo phương pháp của Trần Linh Thuớc (2009) [57]. Những khuẩn lạc có kiểu hình đặc trưng của *Vibrio* phân lập từ mẫu cá biển bị bệnh và nước nuôi thủy sản mọc trên môi trường TCBS agar được đánh giá về các đặc tính sinh hóa nhằm bước đầu xác định được dòng vi khuẩn *Vibrio* spp. gây bệnh. Phương pháp đánh giá một số đặc tính sinh hóa của vi khuẩn như khả năng lên men, sinh H<sub>2</sub>S, sinh gas, sinh indol, sinh catalase, khả năng di động và khả năng gây dung huyết của các chủng vi khuẩn.

Phản ứng lên men đường trong môi trường KIA: Phương pháp này xác định khả năng sử dụng nguồn carbohydrate (glucose/lactose), sinh khí trong quá trình lên men và sinh H<sub>2</sub>S. Môi trường KIA gồm glucose, lactose, đỏ phenol (phenol red), peptone, cao thịt, cao nấm men, natri clorua, natri thiosunfat và sắt sunfat. Phenol đỏ là chất chỉ thị pH. Sự sản xuất acid bởi quá trình lên men lactose/glucose dẫn đến làm đổi màu chất chỉ thị từ màu đỏ sang màu vàng.

Ống nghiệm chứa môi trường tổng hợp KIA được khử trùng và nghiêng ống thạch sao cho phần thạch nghiêng bằng 2 lần phần thạch đứng. Cấy ria vi khuẩn lên

bề mặt thạch nghiêng và cấy đâm sâu vào phần môi trường thạch đứng. Nuôi vi khuẩn ở nhiệt độ 28°C trong 24 giờ và ghi nhận kết quả về:

Khả năng sử dụng đường: Đối với vi khuẩn không lên men lactose, ban đầu tạo màu vàng ở cả phần thạch nghiêng và thạch đứng của ống nghiệm do sự lên men glucose sinh acid. Do nồng độ của glucose rất thấp (1%), môi trường nhanh chóng bị cạn kiệt glucose. Khi glucose được sử dụng hết trong môi trường hiếu khí (thạch nghiêng), quá trình oxi hóa các acid diễn ra, môi trường trở lại màu đỏ. Quá trình này không diễn ra ở môi trường yếm khí (thạch đứng), do đó phần đáy ống nghiệm chứa thạch đứng vẫn giữ màu vàng trong khi vùng thạch nghiêng là màu đỏ. Đối với vi khuẩn lên men lactose, quá trình lên men tạo acid dẫn đến môi trường trong ống nghiệm (cả thạch nghiêng và thạch đứng) đều chuyển màu vàng. Do nồng độ lactose cao, lượng acid được tạo ra lớn giúp duy trì độ pH acid của môi trường trong điều kiện hiếu khí ở vùng thạch nghiêng. Ống nghiệm không đổi màu cho thấy không có sự lên men của cả glucose và lactose.

Khả năng sinh H<sub>2</sub>S: Ống thạch chuyển màu đen do vi khuẩn có khả năng sinh H<sub>2</sub>S từ natri thiosunfat tạo kết tủa với ion sắt có trong môi trường.

Khả năng sinh khí: Nếu vi khuẩn sinh khí, có khí ở phần đáy của ống nghiệm sẽ dẫn đến vết rạn ở vùng môi trường dưới đáy ống nghiệm hoặc đẩy môi trường lên khỏi đáy ống nghiệm.

Khả năng sinh indol: Vi khuẩn được nuôi trong ống ficol chứa môi trường lỏng tryptone water (10 ml/ống) ở nhiệt độ 28°C. Sau 24 giờ nuôi cấy, bổ sung 1 ml xylene vào ống nghiệm, lắc đều để chiết tách indol lên lớp dung môi hữu cơ, nhỏ 1 - 2 giọt thuốc thử Kovac's. Amino acid tryptophan trong môi trường bị oxi hóa bởi những vi khuẩn có hệ enzym tryptophanase sẽ tạo sản phẩm chứa gốc indol khi nhỏ thuốc thử vào, nó sẽ phản ứng với thuốc thử tạo một phức chất dạng quinone màu đỏ, nổi trên bề mặt ống. Ngược lại, không tạo phức chất có màu đỏ sẽ cho kết quả âm tính (-).

Khả năng sinh catalase: Vi khuẩn lấy từ môi trường thạch được đặt lên lam kính sạch rồi nhỏ 1 - 2 giọt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Sau 1 - 2 phút quan sát: kết quả nếu có hiện tượng sủi bọt khí là dương tính, nếu không có hiện tượng sủi bọt khí là âm tính.

Thử khả năng di động của vi khuẩn: Chuẩn bị ống nghiệm chứa môi trường LB bán thạch với 0,8% agar, thạch đứng. Dùng que cấy lấy vi khuẩn rồi đưa sâu vào bên trong môi trường thạch, kiểm tra kết quả phản ứng sau 24 - 48 giờ. *Vibrio* có 01 tiêm mao nên có khả năng di động, làm đục môi trường xung quanh, mọc lan ra khỏi đường cấy, do đó cho kết quả dương tính (+) với thử nghiệm này. , cho kết



quả âm tính (-) với những chủng vi khuẩn không có tiêm mao, không làm đục môi trường, chỉ mọc trên đường cấy.

### **2.3.2.3. Phương pháp đánh giá tính kháng kháng sinh của vi khuẩn**

Đánh giá tính kháng kháng sinh được tiến hành theo tiêu chuẩn của Clinical and Laboratory (CLSI) (2006) với đường kính vòng vô khuẩn là:  $\geq 20$  mm – nhạy cảm với kháng sinh, từ 15 đến 19 mm – nhạy cảm trung bình với kháng sinh và  $<14$  mm kháng kháng sinh [75][78]. Các chủng vi khuẩn được cấy trải trên môi trường BHI agar (50  $\mu$ l/ 01 đĩa thạch, nồng độ  $10^6$  CFU/ml), sau đó, các đĩa này được đặt các mảnh giấy tẩm kháng sinh ampicillin 25  $\mu$ g (AM25), amoxicillin 10  $\mu$ g (AML10), doxycycline 30  $\mu$ g (DO30), oxytetracycline 30  $\mu$ g (OTC30), ceftiofur 30  $\mu$ g (EFT30), streptomycin 10  $\mu$ g (S10), amikacin 30  $\mu$ g (AK30), chloramphenicol 30  $\mu$ g (C30), florfenicol 30  $\mu$ g (FFC30), rifampicin 10  $\mu$ g (RA10), aztreonam 30  $\mu$ g (ATM30), enrofloxacin 5  $\mu$ g (ENR5), ciprofloxacin 5  $\mu$ g (CIP5) (Mast Diagnostics, Anh) lên bề mặt môi trường, nuôi vi khuẩn ở 28°C, sau 48 giờ đánh giá kết quả đường kính vòng vô khuẩn.

### **2.3.3. Phương pháp đánh giá độc lực của các chủng vi khuẩn**

Cá được gây nhiễm theo phương pháp tiêm dưới da của Gao và cộng sự (2014) [79] với liều lượng 100  $\mu$ l/con với nồng độ  $10^8$  CFU/ml và theo dõi tỷ lệ sống sót trong 14 ngày. Mỗi một lô thí nghiệm bao gồm 30 con cá mú chấm cam khỏe mạnh được tiêm gây nhiễm chủng vi khuẩn phân lập. Cá được tiêm dung dịch PBS (100  $\mu$ l/con) được sử dụng làm mẫu đối chứng âm. Sau 24 giờ gây nhiễm (ngày 0), bắt đầu theo dõi và đánh giá tỉ lệ sống sót của cá mú trong 14 ngày sau tiêm, từ ngày 1 đến ngày 14. Thí nghiệm được nhắc lại 03 lần.

$$\text{Tỉ lệ sống sót (\%)} = (\text{số lượng cá sống sót/số lượng cá thí nghiệm}) \times 100$$

Dựa vào tỉ lệ sống sót của cá sau gây nhiễm chọn lọc các chủng vi khuẩn độc lực cao để định danh bằng gene 16S rRNA.

### **2.3.4. Phương pháp định danh chủng vi khuẩn bằng gene 16S rRNA**

Các chủng vi khuẩn sau khi chọn lọc được nuôi tăng sinh trong môi trường LB bổ sung 1,5% NaCl, ở 28°C, 180 vòng/phút, trong 12 - 16 giờ ( $OD_{600} = 0.8 - 1.0$ ). DNA vi khuẩn được tách bằng G-spin™ Total DNA Extraction Mini Kit (Intron, Hàn Quốc) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA được kiểm tra bằng máy Nanodrop (Thermo Scientific, Canada). Tiến hành khuếch đại đoạn gene 16S rRNA với cặp mồi 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1392R (5'-

GGTTACCTTGTTACGACTT-3') theo W. G. Weisburg và cộng sự [80]. Thành phần phản ứng PCR với thể tích 50 µl: 2 µl DNA, 25 µl Master mix 2X, 1 µl mỗi 27F, 1 µl mỗi 1392R và 21 µl dH<sub>2</sub>O với nhiệt độ 95°C biến tính trong 5 phút, 35 chu kỳ (95°C trong 30 giây, gắn mỗi ở 56°C trong 30 giây, kéo dài mạch ở 72°C trong 1 phút), kết thúc phản ứng (72°C trong 5 phút, 25°C trong 5 phút). Điện di sản phẩm PCR trên agarose 1% kiểm tra kích thước và gửi đi giải trình tự tại First Base Laboratories (Malaysia).

### 2.3.5. Phương pháp xác định giá trị LD50

Các chủng vi khuẩn đã được định danh bằng phương pháp giải trình tự gene 16S rRNA được tiếp tục đánh giá giá trị LD50 trên cá mú. Phương pháp xác định giá trị LD50 của các chủng vi khuẩn được tiến hành trên cá mú chấm cam theo phương pháp của Reed và Muench (1938) [81]. Cá mú được tiêm 100 µl/con với các liều lượng khác nhau từ 10<sup>1</sup> – 10<sup>9</sup> CFU/ml. Số lượng cá ở mỗi lô với mỗi liều lượng gây nhiễm là 30 con. Tiến hành theo dõi và đánh giá tỉ lệ sống của cá sau 14 ngày gây nhiễm. Giá trị LD50 được tính theo công thức:

$$LD50 = 10^{(a+x)}$$

Trong đó:

10<sup>a</sup>: liều lượng tại đó số lượng cá sống và cá chết sau thí nghiệm là 50%;

x = (Pa – 50)/(Pa – Pu); trong đó: Pa, Pu là tỉ lệ cận trên và cận dưới của nồng độ gây chết 50%.

### 2.3.6. Phương pháp giữ giống

Các mẫu vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường lỏng LB broth có 1,5% NaCl; ở nhiệt độ 28°C, lắc 180 vòng/phút; hoặc nuôi cấy trên đĩa môi trường chọn lọc TCBS trong tủ ấm 28 °C. Vi khuẩn được giữ trong môi trường LB broth lỏng có bổ sung 20% glycerol (Merck, Germany) ở điều kiện -80°C.

### 2.3.7. Phương pháp xác định trình tự gene kháng nguyên

DNA tổng số của các chủng vi khuẩn *Vibrio* đã được định danh sẽ được sử dụng làm khuôn để thực hiện phản ứng PCR. Các mồi sẽ được thiết kế trên phần mềm Snapgen 6.1 để khuếch đại các gene kháng nguyên là các protein màng ngoài OmpK và OmpU dựa trên các trình tự đã công bố trên NCBI [19]. Sản phẩm khuếch đại 02 gene kháng nguyên từ *V. parahaemolyticus* hoặc *V. alginolyticus* phân lập được sẽ tách dòng vào vector tách dòng và giải trình tự bằng máy giải trình tự DNA tự động. Trình tự gene được phân tích bằng phần mềm Snapgen 6.1.

### 2.3.8. Phương pháp tạo protein tái tổ hợp mang gene kháng nguyên

#### 2.3.8.1. Tạo tế bào khả biến *E. coli* DH5 $\alpha$ và *E. coli* BL21

Vi khuẩn được nuôi lắc trong môi trường LB ở 37° C, 170 vòng/phút, qua đêm. Sau đó, lấy 200  $\mu$ l dịch khuẩn cho vào bình dung tích 100ml chứa 20 ml môi trường LB, nuôi lắc ở 37°, 170 vòng/phút, trong khoảng 3 giờ đến khi OD<sub>600</sub> = 0,5 – 0,6. Chuyển dịch nuôi vào các ống eppendoft, ly tâm dịch ở 4° C, 4000 vòng/phút, trong 10 phút, thu sinh khối, bỏ dịch. Bổ sung 1 ml CaCl<sub>2</sub> (50mM) lạnh, ủ đá 30 phút, ly tâm 4° C, 4000 vòng/phút, 7 phút, bỏ dịch, thu cặn. Bổ sung tiếp 1 ml CaCl<sub>2</sub> (50mM) lạnh, ủ đá 10 phút, ly tâm 4° C, 4000 vòng/phút, 7 phút, bỏ dịch, thu cặn. Bổ sung 50  $\mu$ l CaCl<sub>2</sub> (50 mM) và 12,5  $\mu$ l glycerol. Các ống tế bào được làm đông nhanh trong ni tơ lỏng sau đó được bảo quản ở tủ -80° C.

#### 2.3.8.2. Phản ứng gắn đoạn gene đặc hiệu vào vector nhân dòng

Trình tự của 02 gene kháng nguyên sẽ được khuếch đại với cặp môi đặc hiệu. Các sản phẩm PCR mã hóa các gene kháng nguyên được đưa vào pGEM®-T Easy Vector và pCE2 TA/Blunt-Zero với thành phần phản ứng như bảng 2.1 và 2.2 sau đó được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$  bằng phương pháp sốc nhiệt.

**Bảng 2.1.** Thành phần phản ứng gắn gene vào pGEM®-T Easy Vector

STT	Thành phần	Thể tích ( $\mu$ l)
1	2X Rapid Ligation Buffer	5
2	DNA	3
3	pGEM®-T Easy Vector (50 ng/ $\mu$ l)	1
4	T4 DNA Ligase	1
Tổng		10

**Bảng 2.2.** Thành phần phản ứng gắn gene vào pCE2 TA/Blunt-Zero

STT	Thành phần	Thể tích ( $\mu$ l)
1	pCE2 TA-Zero Cloning	1
2	DNA	3
3	Nước deion khử trùng	1
Tổng		5

Đối với hỗn hợp gắn vào pGEM®-T Easy Vector sẽ được trộn đều và ủ qua đêm ở 4° C, hỗn hợp gắn vào pCE2 TA/Blunt-Zero trộn và ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng.

### 2.3.8.3. *Biến nạp vector tách dòng pGEM\_OmpK và pCE2\_OmpU vào tế bào khả biến E. coli DH5α bằng phương pháp sốc nhiệt*

Hỗn hợp vector chứa DNA plasmid được đưa vào 100  $\mu$ l tế bào khả biến, ủ đá 30 phút sau đó sốc nhiệt ở 42°C trong 45 giây, tế bào sau khi sốc nhiệt được ủ 2 phút trong đá. Sự thay đổi nhiệt độ đột ngột giúp DNA plasmid dễ dàng xâm nhập vào tế bào vi khuẩn. Bổ sung 400  $\mu$ l môi trường LB lỏng, nuôi lắc 200 vòng/phút, ở 37°C trong 1 giờ. Các dòng vi khuẩn biến nạp sẽ được chọn lọc trên đĩa môi trường LB bổ sung ampicillin (100 $\mu$ g/ml) đối với pGEM®-T Easy Vector và kanamycin (50  $\mu$ g/ml) đối với pCE2 TA/Blunt-Zero, Xgal (40 mg/ml), IPTG (400 mg/ml).

### 2.3.8.4. *Tách chiết và định lượng DNA plasmid*

Tách chiết DNA plasmid bằng cách sử dụng bộ kit DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kit (Intron Biotechnology, Hàn Quốc). Định lượng DNA plasmid thu được bằng cách đo độ hấp thụ ánh sáng tử ngoại của các acid nucleic ở bước sóng 260 nm. DNA plasmid tinh sạch có tỉ lệ  $A_{260} / A_{280}$  trong khoảng 1,8 – 2,0. Thu dịch chứa DNA, chạy điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.

### 2.3.8.5. *Chọn lọc các dòng vi khuẩn chứa plasmid mang gene đích*

Các dòng vi khuẩn mang plasmid chứa gene đích sẽ được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR với các cặp mồi đặc hiệu cho *OmpK* và *OmpU*. Kết quả tạo dòng được kết luận bằng phương pháp giải trình tự (công ty 1<sup>st</sup> BASE DNA Sequencing Division, Malaysia).

**Bảng 2.3.** Thành phần phản ứng PCR kiểm tra các dòng vi khuẩn mang gene *OmpK* và *OmpU*

STT	Thành phần	Thể tích ( $\mu$ l)
1	Nước deionized	3
2	DNA plasmid	1
3	Master Mix 2X	5
4	Mồi xuôi	0,5
5	Mồi ngược	0,5
Tổng		10

### *Cắt plasmid pGEM\_OmpK và pCE2\_OmpU bằng enzyme cắt giới hạn*

Các dòng vi khuẩn mang plasmid chứa gene đích (pGEM\_OmpK và pCE2\_OmpU) sẽ được nuôi cấy và tách plasmid. Plasmid sau tách chiết được xử lý bằng enzyme cắt giới hạn *Bam*HI và *Hind*III (ủ 37°C, 1 giờ). Sản phẩm sau khi được xử lý sẽ chạy điện di trên gel agarose 1%, cắt phần gel có chứa đoạn gene

đích và tinh sạch bằng kit DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kit (Intron) để gắn vào vector pET-28a(+).

**Bảng 2.4.** Thành phần cắt plasmid bằng enzyme cắt giới hạn *Hind*III và *Bam*HI

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	Nước deionized	8
2	Buffer 10X R	2
3	pGEM_OmpK/ pCE2_OmpU	8
4	Enzyme <i>Hind</i> III (10u/μl)	1
5	Enzyme <i>Bam</i> HI (10u/μl)	1
Tổng		20

Vector pET-28a(+) được xử lý đồng thời bằng hai enzyme cắt giới hạn là *Hind*III và *Bam*HI. Thành phần của phản ứng được trình bày ở Bảng 2.5. Hỗn hợp của phản ứng được ủ 37°C trong 1 giờ, sau đó chạy điện di trên gel agarose 1%. Thu và tinh sạch DNA plasmid sau khi cắt từ gel agarose, tinh sạch bằng DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kit (Intron) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và bảo quản ở - 20°.

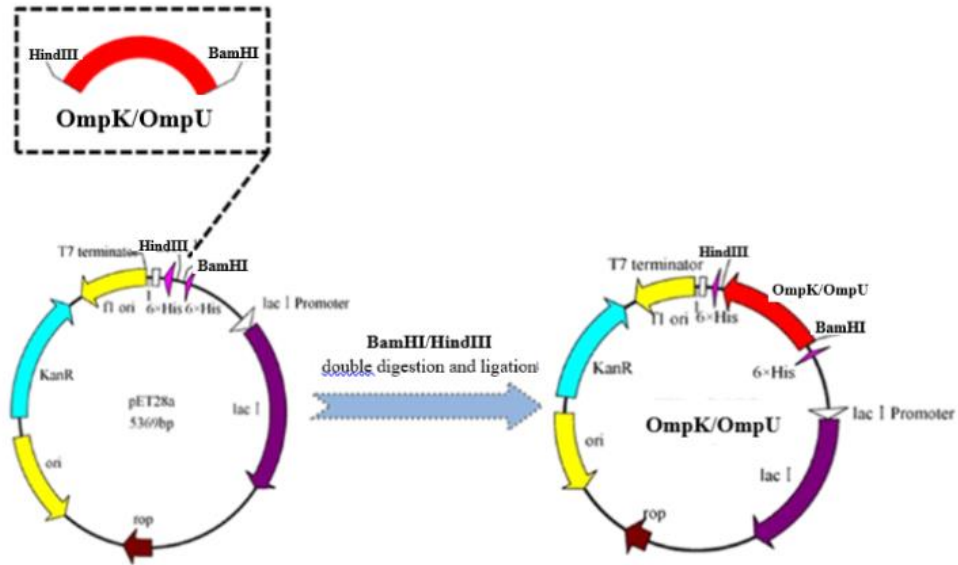
**Bảng 2.5.** Xử lý vector pET28a(+) bằng enzyme cắt giới hạn *Hind*III và *Bam*HI

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	Nước deionized	10
2	Buffer 10X R	2
3	pET-28a(+)	6
4	Enzyme <i>Hind</i> III (10u/μl)	1
5	Enzyme <i>Bam</i> HI (10u/μl)	1
Tổng		20

Vector pET-28a(+) và DNA plasmid sau khi được xử lý bằng 2 enzyme *Bam*HI và *Hind*III sẽ được nối với nhau bằng enzyme T4 ligase, hỗn hợp được ủ qua đêm, ở 4°C. Thành phần phản ứng như bảng 2.5.

**Bảng 2.6.** Gắn gene vào vector biểu hiện pET-28a

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	10X Buffer T4 ligase	1
2	Gene đích	7
3	Vector pET28a(+)	1
4	T4 ligase	1
Tổng		10



**Hình 2.1.** Sơ đồ vector biểu hiện pET28a(+) mang gene mã hóa protein OmpK/OmpU

#### 2.3.8.6. Biến nạp DNA plasmid vào tế bào khả biến *E. coli* BL21 bằng phương pháp sốc nhiệt

Plasmid mang vector tái tổ hợp sẽ được biến nạp vào *E. coli* BL21 bằng phương pháp sốc nhiệt như mô tả ở mục 2.3.8.3. Các dòng vi khuẩn tái tổ hợp được chọn lọc trên môi trường LB agar bổ sung kanamycin với nồng độ cuối cùng đạt 50µg/ml. Kiểm tra lại bằng việc cắt plasmid bằng hai enzyme là *HindIII* và *BamHI*. Kết quả thiết kế vector tái tổ hợp được kết luận bằng phương pháp giải trình tự (công ty 1<sup>st</sup> BASE DNA Sequencing Division, Malaysia).

#### 2.3.9. Phương pháp biểu hiện gene đích trong *E. coli* BL21.

Chủng *E. coli* BL21 tái tổ hợp được nuôi trong môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh kanamycin 50µg/ml, nuôi lắc ở 37°C, 200 vòng/ phút qua đêm. Chuyển 2% dịch nuôi sang môi trường mới, tiếp tục nuôi cho tới khi mật độ khuẩn (OD<sub>600</sub>) đạt 0,5 đến 0,8. Bổ sung IPTG (1mM) để cảm ứng biểu hiện gene. Sau 3-5 giờ, thu tế bào bằng cách li tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút, hòa cạn trong đệm TE (10mM Tris-HCl pH 8 và 1mM EDTE) cạn sao cho OD<sub>600nm</sub> = 10. Protein tái tổ hợp được kiểm tra bằng điện di trên gel SDS-PAGE.

#### 2.3.10. Phương pháp thu và tinh sạch protein tổng số

Protein tái tổ hợp được gắn 6-His nên được tinh sạch bằng cột sắc kí ái lực ProBond Nickel-Chelating Resin (Thermo). Phương pháp này dựa trên liên kết giữa

ion  $\text{Ni}^{2+}$  và vòng imidazole của histidin. Các ion kim loại trên cột sẽ liên kết với vòng imidazole của histidin và giữ lại protein trên cột khi có protein mang amino acid histidine đi qua.

Chọn một khuẩn lạc chứa plasmid tái tổ hợp trên đĩa LB agar bổ sung 50  $\mu\text{g/ml}$  kanamycin vào 50 ml môi trường LB lỏng bổ sung kháng sinh kanamycin 50  $\mu\text{g/ml}$ . Dịch khuẩn khi đo ở  $A_{260}$  đạt 0,6 – 0,8 bổ sung IPTG nồng độ cuối là 1 mM, tiếp tục nuôi lắc 200 vòng/phút, ở 37°C 3-5 giờ. Thu sinh khối thể bào bằng phương pháp li tâm ở 4°C, trong 10 phút, 9.000 vòng/phút. Hòa tan tủa bằng buffer NPB1X (Tris-HCl 1M pH =7,5, NaCl 0,2 M, 10% v/v glycerol, imidazole 20 mM). Sau đó phá tế bào bằng siêu âm trên đá, mỗi lần 10 giây, dừng 10 giây cho đến khi dịch trong. Sau khi phá tế bào, li tâm dịch ở 10.000 vòng/phút, trong 20 phút ở 4°C, thu dịch.

Cân bằng cột Ni – Chelating Resin bằng buffer NPB1X, sau đó đưa dịch protein thu được ở trên lên cột, rửa cột với buffer NWB chứa 50 mM imidazole với thể tích bằng 10 lần thể tích cột để loại protein bám không đặc hiệu. Protein đích được đẩy ra khỏi cột bằng buffer NEB (NPB1X, 500 mM imidazole). Thẩm tích protein trong đệm thẩm tích (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% v/v glycerol ở 4° C) và bảo quản ở -80° C.

### 2.3.11. Phương pháp điện di protein trên gel polyacrylamide

Gel polyacrylamide 12% được chuẩn bị với thành phần như bảng 2.7.

**Bảng 2.7.** Thành phần và các dung dịch đệm SDS-PAGE

Thành phần	Gel tách	Gel cô
H <sub>2</sub> O	2,7 ml	3 ml
Tris-HCl 1,5 M, pH = 8,8	2 ml	
Tris – HCl 0,5 M, pH = 6,8		1,25 ml
Dung dịch Acrylamide 30%	3,2 ml	0,7 ml
SDS 10%	80 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
TEMED	8 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$
APS 10%	80 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$

Protein sau khi được biến tính bằng sample buffer 5X (0,6M Tris-HCl pH 6,8; 2% w/v SDS; 25% v/v Glycerol; 0,1 w/v Bromophenol Blue; 14,4 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) và ủ ở 95° C trong 15 phút, ly tâm ngắn và tra mẫu vào giếng trên gel đã được chuẩn bị. Mẫu được chạy điện di trong khoảng 1,5 giờ, cường độ dòng điện 40 mA. Gel sau khi chạy điện di được ủ với dung dịch nhuộm (0,1% w/v CBB

R250, 10% v/v acetic acid, 30% v/v methanol) trong khoảng 40 phút, sau đó rửa gel bằng dung dịch rửa (30% v/v methanol, 10% v/v acetic acid) cho đến khi có thể quan sát bằng điện di

### 2.3.12. Phương pháp đánh giá khả năng tạo đáp ứng miễn dịch của protein tái tổ hợp trên cá mú

Đánh giá khả năng tạo đáp ứng miễn dịch được thực hiện theo phương pháp của Gao Yuan và cộng sự (2014) [79] có cải tiến.

Protein sau khi tinh sạch được pha loãng bằng dung dịch PBS với nồng độ cuối cùng 1 mg/ml để đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch .

Thí nghiệm gồm 6 nhóm (30 con/nhóm):

Nhóm 1 + 2: tiêm 100 µl protein tái tổ hợp OmpU của *V. alginolyticus*

Nhóm 3 + 4: tiêm 100 µl protein tái tổ hợp OmpK của *V. alginolyticus*

Nhóm 5 + 6: đối chứng âm được tiêm 100 µl PBS 0,01 M vô trùng (pH 7,4)

Cá được tiêm 2 mũi (ngày 1, ngày 14 ) với liều lượng và phương pháp như lần đầu, 14 ngày sau khi tiêm protein tái tổ hợp mũi 2 tiến hành tiêm công cường độc chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* cho cả 3 nhóm thí nghiệm (Nhóm 1, 3, 5)(100 µl/con) và nhóm 2, 4, 6 được tiêm chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* với liều lượng 100 µl/con.

Sau 24 giờ tiêm công cường độc với chủng vi khuẩn , theo dõi và đánh giá số lượng cá chết trong 14 ngày. Tỷ lệ bảo hộ (RPS) của protein tái tổ hợp mang gene kháng nguyên được tính theo công thức của Amend (1981) [82].

$$RPS (\%) = \left( 1 - \frac{\text{Số cá tiêm protein tái tổ hợp chết (con)}}{\text{Số cá tiêm PBS đối chứng chết (con)}} \right) \times 100\%$$

### 2.3.13. Phương pháp xử lý số liệu

Phân tích và xử lý số liệu: Số liệu được phân tích bằng sử dụng phần mềm Microsoft Excel 2013 và phần mềm SPSS 20, so sánh trung bình One-way ANOVA (Turkey's test).



### Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập các chủng vi khuẩn *Vibrio* spp. từ mẫu cá bệnh và nước nuôi thủy sản

3.1.1. Phân lập vi khuẩn trên môi trường chọn lọc

Mẫu cá biển nghi mắc bệnh và mẫu nước nuôi thủy sản được thu thập từ năm khu vực thuộc năm tỉnh phía Bắc: xã Giao Phong, Giao Thủy (Nam Định); phường Tràng Cát, Hải An (Hải Phòng); xã Hạ Long, Vân Đồn (Quảng Ninh); xã Thái Thượng, Thái Thụy (Thái Bình) và xã Kim Trung, Kim Sơn (Ninh Bình). Các mẫu sau khi thu thập được dùng để phân lập *Vibrio* spp. trên môi trường chọn lọc TCBS và Chromagar™ *Vibrio*. Kết quả thu được 22 chủng vi khuẩn có đặc điểm hình thái phù hợp với đặc điểm được mô tả của *Vibrio*. Trong đó, 10 mẫu (45,45%) được phân lập từ mẫu nước nuôi thủy sản và 12 mẫu (54,55%) phân lập từ mẫu cá bệnh (Bảng 3.1 và bảng 3.2).

**Bảng 3.1.** Các vi khuẩn phân lập từ nước nuôi thủy sản

STT	Tên mẫu	Địa điểm thu mẫu	Đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên môi trường TCBS	Đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên môi trường Chromagar™ <i>Vibrio</i>	Chủng vi khuẩn được xác định dựa vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc
1	QN4	Quảng Ninh	Màu xanh, tròn, bóng, D = 3 – 4 mm	Màu tím hoa cà	<i>V. parahaemolyticus</i>
2	QN36	Quảng Ninh	Màu vàng, hình tròn, lồi, bóng D = 1 – 2 mm	Màu trắng	<i>V. alginolyticus</i>
3	NB1	Ninh Bình	Màu vàng, bờ đều, bóng, D = 2 – 3 mm	Màu trắng	<i>V. alginolyticus</i>
4	NB21	Ninh Bình	Màu xanh, bờ đều, bóng, D = 2 – 3 mm	Màu tím hoa cà	<i>V. parahaemolyticus</i>

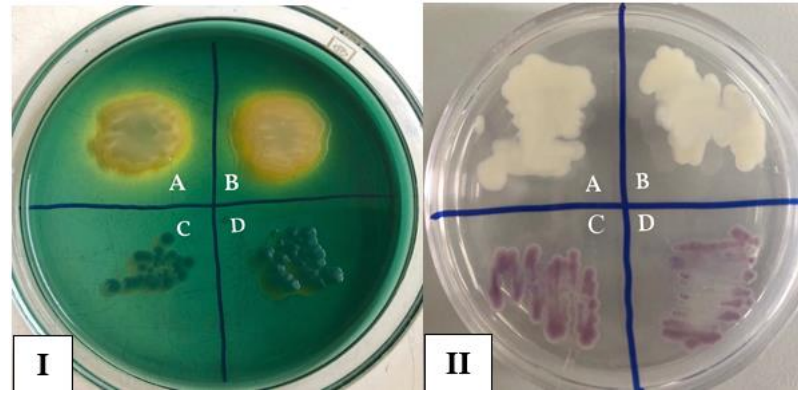
5	ND1	Nam Định	Màu vàng, bờ đều, bóng, D = 1 – 2 mm	Màu trắng	<i>V. alginolyticus</i>
6	ND22	Nam Định	Màu xanh, bờ đều, bóng, D = 2 – 3 mm	Màu tím hoa cà	<i>V. parahaemolyticus</i>
7	TB1	Thái Bình	Màu vàng, bờ đều, bóng, D = 2 – 3 mm	Màu trắng	<i>V. alginolyticus</i>
8	TB3	Thái Bình	Màu vàng, tròn, bóng, nhầy, D = 1 – 2 mm	Màu trắng	<i>V. alginolyticus</i>
9	HP1	Hải Phòng	Màu vàng, hình tròn, lồi, bóng, nhầy, D = 3 – 4 mm	Màu trắng	<i>V. alginolyticus</i>
10	HP4	Hải Phòng	Màu xanh, tròn đều, lồi, D = 1 – 2 mm	Màu tím hoa cà	<i>V. parahaemolyticus</i>

**Bảng 3.2.** Các vi khuẩn phân lập từ mẫu cá bệnh

STT	Tên mẫu	Mẫu cá và địa điểm thu mẫu	Đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên môi trường TCBS	Đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên môi trường Chromagar™ Vibrio	Chủng vi khuẩn được xác định dựa trên hình thái khuẩn lạc
1	A1	Cá bớp Quảng Ninh	Màu xanh, tròn, bóng, D = 2 – 3 mm	Màu tím hoa cà	<i>V. parahaemolyticus</i>
2	A2	Cá chẽm Quảng Ninh	Màu vàng, hình tròn, lồi, bóng, nhầy, D = 3	Màu trắng	<i>V. alginolyticus</i>

			mm		
3	A10	Cá hồng Quảng Ninh	Màu vàng, hình tròn, nhầy, D = 2 – 3 mm	Màu trắng	<i>V. alginolyticus</i>
4	N3	Cá bóp Ninh Bình	Màu vàng, tròn, bóng, D = 3 – 4 mm	Màu trắng	<i>V. alginolyticus</i>
5	N4	Cá hồng Ninh Bình	Màu xanh, tròn đều, lồi, D = 2 – 3 mm	Màu tím hoa cà	<i>V. parahaemolyticus</i>
6	N9	Cá mú Nam Định	Màu xanh, tròn, bóng, D = 2 – 3 mm	Màu tím hoa cà	<i>V. parahaemolyticus</i>
7	N5	Cá chêm Nam Định	Màu vàng, tròn, bóng, D = 3 – 4 mm	Màu trắng	<i>V. alginolyticus</i>
8	N10	Cá mú Nam Định	Màu vàng, tròn, bóng, nhầy, D = 2 – 3 mm	Màu trắng	<i>V. alginolyticus</i>
9	T4	Cá bóp Thái Bình	Màu xanh lá đậm, bờ đều, tròn, bóng, D = 2 – 3 mm	Màu tím hoa cà	<i>V. parahaemolyticus</i>
10	T12	Cá mú Thái Bình	Màu vàng, tròn đều, lồi, nhầy, D = 2 – 3 mm	Màu trắng	<i>V. alginolyticus</i>
11	H6	Cá mú Hải Phòng	Màu xanh lá đậm, bờ đều, tròn, bóng, D = 2 – 3 mm	Màu tím hoa cà	<i>V. parahaemolyticus</i>
12	H15	Cá chêm Hải Phòng	Màu xanh, tròn đều, lồi, D = 1 – 2 mm	Màu tím hoa cà	<i>V. parahaemolyticus</i>

Ghi chú: D: đường kính khuẩn lạc (mm)



**Hình 3.1.** Hình thái khuẩn lạc *Vibrio* spp. phân lập đại diện trên môi trường TCBS (I) và Chromagar<sup>TM</sup>Vibrio (II)

A: *V. alginolyticus* TB3; B: *V. alginolyticus* QN36;

C: *V. parahaemolyticus* NB21; D: *V. parahaemolyticus* ND22

Môi trường TCBS và ChroMagar<sup>TM</sup> Vibrio là môi trường chọn lọc đặc trưng cho nhóm vi khuẩn *Vibrio*. Trên môi trường chọn lọc TCBS, *V. parahaemolyticus* hình tròn đều, đường kính trung bình 2 – 3 mm, không có khả năng sử dụng đường sucrose nên có khuẩn lạc màu xanh. Khuẩn lạc *V. alginolyticus* tròn đều, đường kính trung bình 2 – 4 mm, do quá trình lên men sucrose làm bryothymol blue (thành phần trong TCBS) chuyển sang màu vàng. Tuy nhiên, trên môi trường TCBS agar sẽ không thể phân biệt *V. parahaemolyticus* và *V. vulnificus* bởi cả hai loài đều (-) với sucrose. Vì vậy, cần kết hợp với kết quả trên môi trường Chromagar<sup>TM</sup> Vibrio, bằng công nghệ tạo màu kết hợp độ pH, khuẩn lạc *V. parahaemolyticus* sẽ có màu tím hoa cà, *V. alginolyticus* có màu trắng trong.

Từ đặc điểm của khuẩn lạc trên cả hai môi trường chọn lọc, có thể bước đầu xác định các mẫu có đặc điểm hình thái giống chủng *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus*. Trong đó, từ môi trường nước nuôi thủy sản phân lập được 4 mẫu *V. parahaemolyticus* (40%) và 6 mẫu *V. alginolyticus* (60%); phân lập từ mẫu cá bệnh thu được 6 mẫu *V. parahaemolyticus* (50%) và 6 mẫu *V. alginolyticus* (50%). Kết quả nhuộm Gram cho thấy 22 mẫu phân lập được đều thuộc vi khuẩn Gram (-). Tuy nhiên, để xác định tất cả các khuẩn lạc này đều là *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus*, chúng tôi tiến hành phân tích một số đặc điểm sinh hóa và gene 16S rRNA để định danh loài.

### 3.1.2. Phân tích đặc điểm sinh hóa của các mẫu phân lập

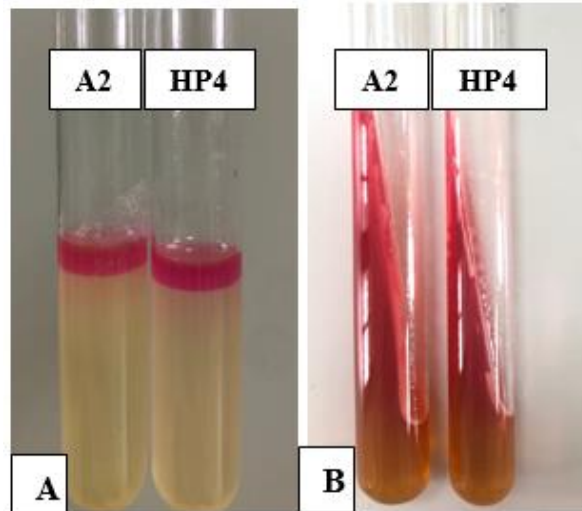
Kết quả đánh giá một số đặc điểm sinh hóa của các mẫu phân lập có đặc điểm hình thái phù hợp với *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus* được thể hiện trong bảng dưới đây (Bảng 3.2).

**Bảng 3.3.** Một số đặc điểm sinh hóa của 22 mẫu *Vibrio* phân lập được

STT	Tên mẫu	Lên men		Indole	Khả năng di động	Catalase	H <sub>2</sub> S
		Glucose	Sucrose				
Nhóm 1: Phân lập từ nước nuôi thủy sản							
1	QN4	+	-	+	+	+	-
2	QN36	+	+	+	+	+	-
3	NB1	+	+	+	+	+	-
4	NB21	+	-	+	+	+	-
5	ND1	+	+	+	+	+	-
6	ND22	+	-	+	+	+	-
7	TB1	+	+	+	+	+	-
8	TB3	+	+	+	+	+	-
9	HP1	+	+	+	+	+	-
10	HP4	+	-	+	+	+	-
Nhóm 2: Phân lập từ cá nghi nhiễm bệnh							
11	A1	+	-	+	+	+	-
12	A2	+	+	+	+	+	-
13	A10	+	+	+	+	+	-
14	N3	+	+	+	+	+	-
15	N4	+	-	+	+	+	-
16	N9	+	-	+	+	+	-
17	N5	+	+	+	+	+	-
18	N10	+	+	+	+	+	-
19	T4	+	-	+	+	+	-
20	T12	+	+	+	+	+	-
21	H6	+	-	+	+	+	-
22	H15	+	-	+	+	+	-

Ghi chú: (+) dương tính, (-) âm tính

Kết quả cho thấy 22 mẫu vi khuẩn có hình thái khuẩn lạc phù hợp với *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus* đều có đặc điểm sinh hóa đặc trưng với đặc điểm sinh hóa của các chủng *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus*: khả năng di động, dương tính với glucose, indole, catalase, gây tan huyết kiểu  $\beta$ , không có khả năng lên men đường lactose, không sinh H<sub>2</sub>S và không sinh khí. Đặc biệt, điểm khác nhau giữa *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus* là *V. alginolyticus* có khả năng lên men đường sucrose còn *V. parahaemolyticus* thì không có khả năng lên men đường sucrose. Đây là một trong những đặc điểm quan trọng để phân biệt hai loài này.

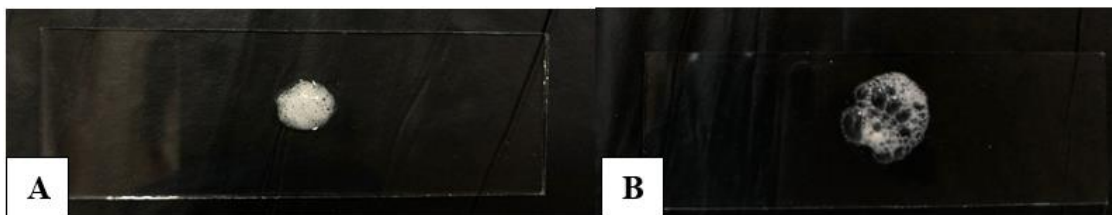


**Hình 3.2.** Đặc điểm sinh hóa của mẫu phân lập của 2 mẫu đại diện A2 và HP4  
*Phản ứng với thuốc thử Kovac do vi khuẩn sinh indole (A); Vi khuẩn lên men glucose trên môi trường KIA (B)*

Trong thí nghiệm đánh giá khả năng sinh indole của 22 mẫu vi khuẩn phân lập được cho thấy có một lớp màu hồng xuất hiện trên bề mặt môi trường (hình 3.2A). Kết quả này có thể do vi khuẩn sinh enzyme tryptophanase đã thủy phân tryptophan trong môi trường tạo các sản phẩm chứa gốc indole kết hợp với thuốc thử Kovac làm xuất hiện lớp màu hồng.

Đánh giá khả năng sử dụng đường của các chủng vi khuẩn phân lập được trên môi trường KIA (hình 3.2B), kết quả cho thấy xuất hiện màu vàng ở phần thạch đứng trong khi phần thạch nghiêng có màu đỏ với 22 chủng vi khuẩn. Điều này chứng tỏ glucose đã được vi khuẩn sử dụng làm nguồn cacbon trao đổi chất mà không sử dụng lactose trong môi trường, môi trường không bị đen hay môi trường thạch bị vỡ cho thấy không có hiện tượng sinh khí  $H_2S$ .

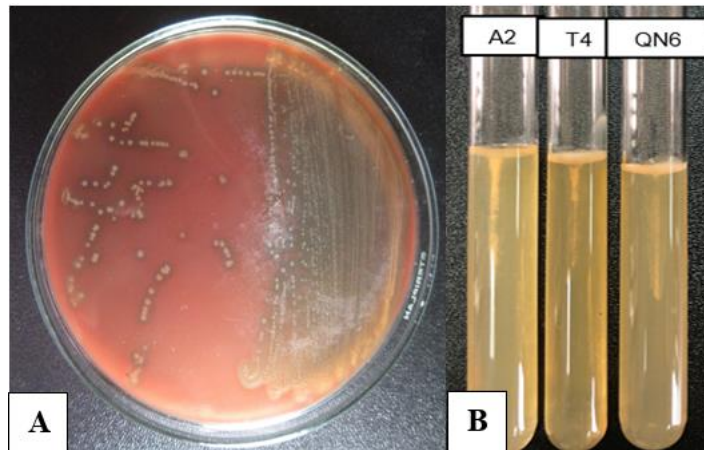
Khi đặt mẫu khuẩn lạc lên giọt dung dịch  $H_2O_2$  cho thấy 22 mẫu đều có hiện tượng sủi bọt khí. Điều này chứng tỏ các mẫu vi khuẩn đã sản sinh ra enzyme catalase xúc tác cho quá trình chuyển hóa  $H_2O_2$  thành  $H_2O$  và  $O_2$ , tạo ra bọt khí.



**Hình 3.3.** Phản ứng sinh catalase làm sủi bọt của mẫu đại diện A2 (A) và mẫu HP4 (B)

Đánh giá khả năng di động của 22 mẫu vi khuẩn cho thấy môi trường xung quanh đường cấy bị đục và vi khuẩn mọc lan ra khỏi đường cấy (hình 3.4B). Khả năng di động có thể do cấu trúc tiêm mao của *Vibrio*.

Đánh giá khả năng tan huyết của 22 mẫu vi khuẩn cho thấy tất cả đều gây tan huyết dạng  $\beta$ , không xuất hiện hồng cầu xung quanh và tạo một vòng tròn trong suốt xung quanh khuẩn lạc (hình 3.4A).



**Hình 3.4.** Kết quả đánh giá khả năng gây hiện tượng tan huyết trên môi trường thạch máu của chủng vi khuẩn A2 (A), phản ứng di động trên môi trường bán lỏng của các chủng A2, T4, QN6 (B)

Như vậy, 22 mẫu vi khuẩn phân lập được có đặc điểm hình thái, sinh hóa đặc trưng của *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus*. Bước đầu có thể nhận định 10 chủng: A1, QN4, NB21, N4, ND22, N09, T4, HP4, H6, H15 đều có hình thái khuẩn lạc, đặc điểm sinh hóa thuộc *V. parahaemolyticus* và 12 chủng: A2, A10, QN36, NB1, N3, ND1, N05, N10, TB1, TB3, T12, HP1 thuộc *V. alginolyticus*.

### 3.1.3. Đánh giá đặc tính kháng một số loại kháng sinh của các mẫu phân lập

Bên cạnh việc đánh giá một số đặc điểm sinh hóa, chúng tôi còn tiến hành đánh giá khả năng kháng một số loại kháng sinh của 22 mẫu vi khuẩn phân lập này. Mức độ kháng kháng sinh được dựa trên đường kính vòng kháng khuẩn (Bảng 3.4)

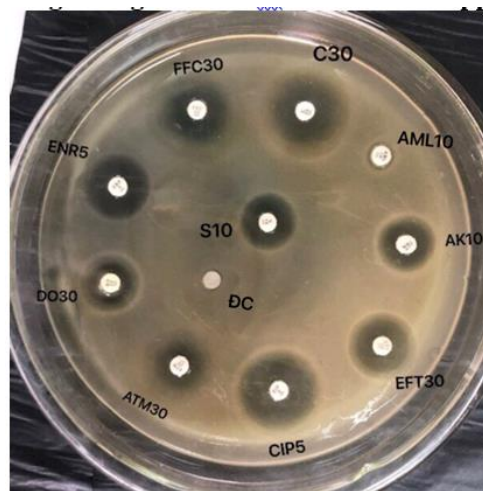
**Bảng 3.4.** Đặc tính kháng 10 loại kháng sinh của vi khuẩn *Vibrio* phân lập

STT	Tên mẫu	Tính kháng kháng sinh									
		DO 30	AML 10	S 10	ENR 5	C 30	AK 30	FFC 30	ATM 30	CIP 5	EFT 30
Nhóm 1: Phân lập từ nước nuôi thủy sản											
1	A1	I	R	R	I	S	R	I	R	R	R
2	A2	I	R	R	R	I	R	I	R	R	R

3	A10	R	R	R	R	S	R	I	R	R	R
4	QN4	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
5	QN36	I	R	R	R	S	R	S	I	R	I
6	NB1	R	R	R	R	S	R	I	R	R	R
7	NB21	R	R	R	I	I	I	R	R	R	R
8	N3	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R
9	N4	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
10	ND1	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R
Nhóm 2: Phân lập từ mẫu cá nghi nhiễm bệnh											
11	ND22	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R
12	N09	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
13	N05	R	R	R	I	R	R	I	R	R	R
14	N10	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R
15	TB1	I	R	R	R	I	R	R	R	R	R
16	TB3	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
17	T4	I	R	R	S	S	R	I	R	R	R
18	T12	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
19	HP1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
20	HP4	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R
21	H6	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
22	H15	R	R	R	I	I	R	I	R	S	R

*Ghi chú: S - mẫn cảm; I - nhạy trung bình; R – kháng.*

EFT30 (ceftiofur 30 $\mu$ g), AML10 (amoxicillin 10  $\mu$ g), S10 (streptomycin 10  $\mu$ g), ENR5 (enrofloxacin 5  $\mu$ g), DO30 (doxycycline 30  $\mu$ g), C30 (chloramphenicol 30  $\mu$ g), AK30 (amikacin 30  $\mu$ g), FFC30 (florfenicol 30  $\mu$ g), ATM30 (aztreonam 30  $\mu$ g), CIP5 (ciprofloxacin 5  $\mu$ g).



**Hình 3.5.** Kết quả xác định đường kính vòng kháng khuẩn ở một số loại kháng sinh của chủng vi khuẩn TB3

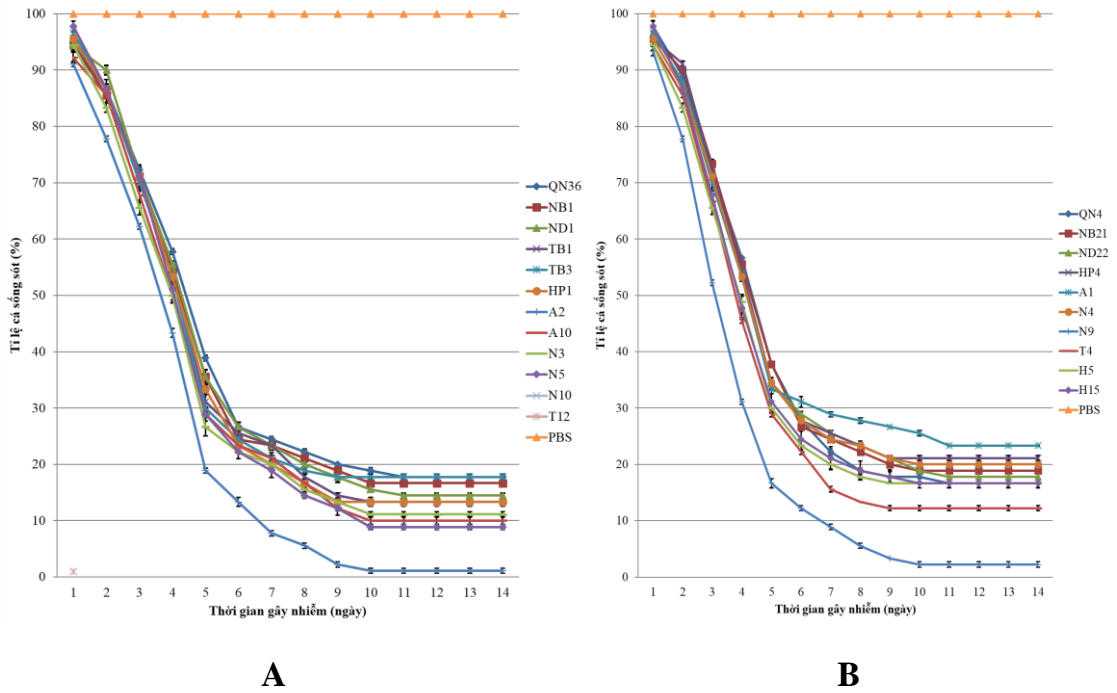


Tất cả các mẫu vi khuẩn phân lập được đánh giá tính kháng kháng sinh với 10 loại kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Nồng độ kháng sinh và tiêu chuẩn đánh giá tính kháng kháng sinh dựa trên tiêu chuẩn của Clinical and Laboratory (CLSI) (2006) [78]. Kết quả cho thấy 100% các mẫu vi khuẩn kháng với amoxicillin 10 µg và streptomycin 10 µg. Bốn loại kháng sinh gồm amikacin 30 µg, aztreonam 30 µg, ciprofloxacin 5 µg, ceftiofur 30µg có tỷ lệ vi khuẩn kháng khá cao, dao động từ 81% đến 86%. Kháng sinh doxycycline 30 µg và enrofloxacin 5 µg có tỷ lệ vi khuẩn kháng tương ứng là 68,18% và 63,64%. Kháng sinh có tỷ lệ vi khuẩn kháng thấp nhất là chloramphenicol 30 µg và florfenicol 30 µg đều có tỷ lệ vi khuẩn kháng là 36,36%. Nhiều nghiên cứu đã ghi nhận tính kháng kháng sinh ở *Vibrio* spp., Manjusha và cộng sự (2013) khi phân lập *Vibrio* spp. từ giáp xác và động vật thân mềm tại vùng ven biển Kerala cho thấy 30 mẫu *Vibrio* spp. phân lập được đều kháng 100% với kháng sinh amoxycillin, ampicillin và 67% kháng với streptomycin [61].

Từ kết quả trên nhận thấy, tỉ lệ kháng kháng sinh ở các mẫu vi khuẩn thu thập ở các khu vực nuôi thủy sản còn khá cao. Có thể xuất phát từ nguyên nhân người dân sử dụng kháng sinh điều trị bệnh trong nuôi thủy sản với tần số cao và thiếu kiểm soát. Qua thực trạng này, có thể nhận thấy sự cần thiết cho những nghiên cứu phát triển vaccine thương mại hướng đến một giải pháp nuôi trồng thủy sản mang tính bền vững, giảm việc sử dụng kháng sinh trong nuôi thủy sản ở Việt Nam.

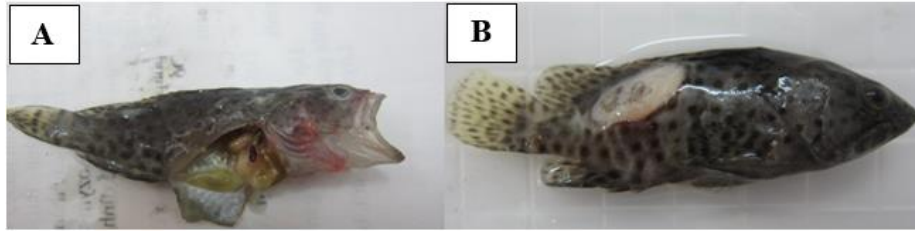
3.2. Đánh giá khả năng gây bệnh trên cá mú chấm cam của các mẫu vi khuẩn phân lập được

Cá mú chấm cam được tiêm với liều lượng  $10^8$  CFU/ml, 100 µl/con. Quan sát triệu chứng cho thấy, 100% cá được gây nhiễm có biểu hiện loét da, xuất huyết, hoại tử gan thận (Hình 3.7). Tỷ lệ sống sót của cá mú chấm cam sau 14 ngày gây nhiễm được trình bày ở hình 3.6.



**Hình 3.6.** Tỷ lệ % sống sót của cá mú sau khi bị gây nhiễm sau 14 ngày với các mẫu *V. alginolyticus* (A) và *V. parahaemolyticus* (B) phân lập ở nồng độ  $10^7$  CFU/ml

Sau 14 ngày gây nhiễm với chủng *V. alginolyticus* (Hình 3.7A) tỷ lệ sống sót của cá mú từ 1,11% đến 17,78%, trong đó, cá gây nhiễm với chủng vi khuẩn A2 có tỷ lệ sống sót thấp nhất (1,11%), ở chủng QN36 và TB3 được ghi nhận tỷ lệ sống sót cao nhất (17,78%). Các chủng vi khuẩn NB1, ND1, A10, N5, N10 có tỷ lệ sống sót lần lượt là 16,67%, 14,44%, 10%, 8,89%, 12,12%. Tỷ lệ cá sống sót ở 13,33% đối với hai chủng gây nhiễm là TB1 và HP1; 11,11% ở chủng vi khuẩn N3 và T12. Tỷ lệ sống sót của cá mú chấm cam sau khi gây nhiễm bởi chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* thấp nhất là 2,22% với chủng N9, cao nhất là 23,33% với chủng A1. Cá được gây nhiễm với ba chủng QN4, H5 và H15 có tỷ lệ sống sót như nhau (16,67%), các chủng NB21, ND22, HP4, N4, T4 có tỷ lệ lần lượt là 18,89%, 17,78%, 21,11%, 20% và 12,12%. Quan sát tỷ lệ sống sót cả cá mú sau khi gây nhiễm có thể thấy, ở tuần đầu cá chết nhiều và chủ yếu ở ngày thứ 2 đến ngày thứ 5 sau khi gây nhiễm. Ở 7 ngày cuối cá chết ít hơn, khoảng dao động cũng thấp hơn so với 7 ngày đầu. Kết quả này khá tương đồng với nghiên cứu của Huyền và cộng sự khi gây nhiễm cá mú chấm cam với 6 chủng vi khuẩn tỷ lệ sống sót từ 2,22% đến 18,89% [83].



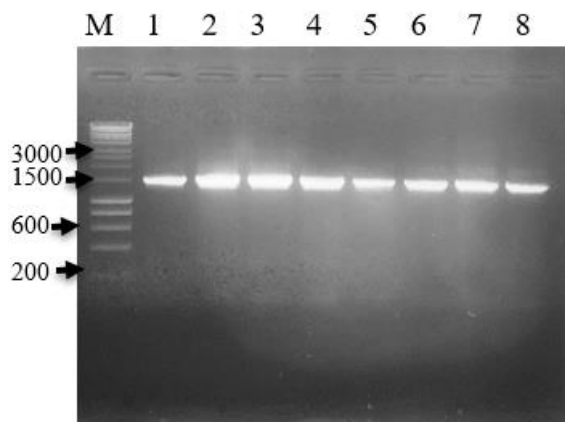
**Hình 3.7.** Hình ảnh cá bị chết do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* N9 (A) và *V. alginolyticus* (B)

Giải phẫu và quan sát nội tạng cá thấy thận và gan bị hoại tử và xuất huyết nghiêm trọng. Phân lập vi khuẩn từ các mẫu cá chết trên môi trường chọn lọc TCBS cho thấy 100% vi khuẩn phân lập được đều có đặc điểm hình thái đặc trưng giống với *V. parahaemolyticus* (khuẩn lạc màu xanh, hình tròn, mặt bóng), và *V. alginolyticus* (khuẩn lạc màu vàng, tròn đều, nhầy), là vi khuẩn gram âm, có khả năng di động, lên men glucose, sinh indole, sinh catalase, không lên men lactose, không sinh khí H<sub>2</sub>S, không sinh khí.

Chúng tôi tiến hành chọn lọc 8 mẫu vi khuẩn có kết quả gây nhiễm vào cho tỉ lệ cá sống sót thấp bao gồm mẫu : A2, N5, A10, N10, N9, T4, QN4, H5 cho các nghiên cứu tiếp theo. Các mẫu vi khuẩn này tiếp tục được định danh bằng phân tích trình tự gene 16S rRNA và xác định giá trị LD50.

### 3.3. Định danh mẫu các chủng *Vibrio* spp. phân lập bằng gene 16S rRNA

Chúng tôi sử dụng cặp mồi 27F và 1392R khuếch đại đoạn trình tự gene 16S RNA của 8 mẫu vi khuẩn chọn lọc. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di gel agarose 1%, kết quả cho thấy sản phẩm PCR có kích thước khoảng 1500 bp (hình 3.8).



**Hình 3.8.** Kết quả điện di sản phẩm PCR gene 16S rRNA của 8 mẫu vi khuẩn trên gel agarose 1%.

M: DNA ladder 10 kb; 1: A2; 2: N5; 3: A10; 4: N10; 5: N9; 6: T4; 7: QN4; 8: H5

Sản phẩm PCR gene 16S rRNA của 8 mẫu được gửi đi giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Trình tự thu được sau đó được so sánh với các trình tự gene 16S rRNA khác trên NCBI bằng công cụ BLAST. Kết quả so sánh trình tự gene 16S rRNA của 8 chủng được thể hiện trong bảng phụ lục 1. Từ dữ liệu về trình tự nucleotide qua công cụ BLAST, có thể xác định được mẫu vi khuẩn thuộc loài sau:

**Bảng 3.5.** Chủng vi khuẩn phân lập được định danh

STT	Tên chủng	Chủng vi khuẩn
1	A2	<i>V.alginolyticus</i>
2	N5	<i>V. alginolyticus</i>
3	A10	<i>V. alginolyticus</i>
4	N10	<i>V. alginolyticus</i>
5	QN4	<i>V. parahaemolyticus</i>
6	H5	<i>V. parahaemolyticus</i>
7	N9	<i>V. parahaemolyticus</i>
8	T4	<i>V. parahaemolyticus</i>

#### 3.4. Xác định giá trị LD<sub>50</sub> của 8 chủng vi khuẩn phân lập

Giá trị LD<sub>50</sub> hay còn gọi là liều gây chết trung bình thể hiện nồng độ gây chết nửa số cá thể được dùng làm thí nghiệm trong khoảng thời gian thử nghiệm. Trong thí nghiệm này giá trị LD<sub>50</sub> được tính theo công thức của Reed và Muench (1938) [81]. Kết quả xác định liều LD<sub>50</sub> thể hiện qua bảng 3.6 và bảng 3.7.

**Bảng 3.6.** Giá trị LD<sub>50</sub> của 4 chủng vi khuẩn thuộc loài *V. alginolyticus*

Nồng độ (CFU/ml)	Số lượng cá thí nghiệm (con)	Số lượng cá chết (con)	Số lượng cá sống (con)	Tỉ lệ chết (%)	Số lượng cá chết cộng dồn (con)	Số lượng cá sống cộng dồn (con)	Tỉ lệ chết cộng dồn (%)
<b>A2</b>							
10 <sup>9</sup>	30	30	0	100,00	140	0	100,00
10 <sup>8</sup>	30	30	0	100,00	110	0	100,00
10 <sup>7</sup>	30	28	2	93,33	80	2	97,56

$10^6$	30	21	9	70,00	52	11	82,54
$10^5$	30	15	15	50,00	31	26	54,39
$10^4$	30	9	21	30,00	16	47	25,40
$10^3$	30	5	25	16,67	7	72	8,86
$10^2$	30	2	28	6,67	2	100	1,96
$10^1$	30	0	30	0,00	0	130	0,00
$x = \frac{P_a - 50}{P_a - P_u} = \frac{54,39 - 50}{54,39 - 25,4} = 0,15$ $LD50 = 10^{(a+x)} = 10^{(5+0,15)} = 10^{5,15}$							
<b>N5</b>							
$10^9$	30	30	0	100,00	108	0	100,00
$10^8$	30	27	3	90,00	78	3	96,30
$10^7$	30	22	8	73,33	51	11	82,26
$10^6$	30	15	15	50,00	29	26	52,73
$10^5$	30	9	21	30,00	14	47	22,95
$10^4$	30	4	26	13,33	5	73	6,41
$10^3$	30	1	29	3,33	1	102	0,97
$10^2$	30	0	30	0,00	0	132	0,00
$10^1$	30	0	30	0,00	0	162	0,00
$x = \frac{P_a - 50}{P_a - P_u} = \frac{52,73 - 50}{52,73 - 22,95} = 0,09$ $LD50 = 10^{(a+x)} = 10^{(6+0,09)} = 10^{6,09}$							
<b>A10</b>							
$10^9$	30	30	0	100,00	92	0	100,00

$10^8$	30	25	5	83,33	62	5	92,54
$10^7$	30	18	12	60,00	37	17	68,52
$10^6$	30	13	17	43,33	19	34	35,85
$10^5$	30	4	26	13,33	6	60	9,09
$10^4$	30	2	28	6,67	2	88	2,22
$10^3$	30	0	30	0,00	0	118	0,00
$10^2$	30	0	30	0,00	0	148	0,00
$10^1$	30	0	30	0,00	0	178	0,00

$$x = \frac{P_a - 50}{P_a - P_u} = \frac{68,52 - 50}{68,52 - 35,85} = 0,57$$

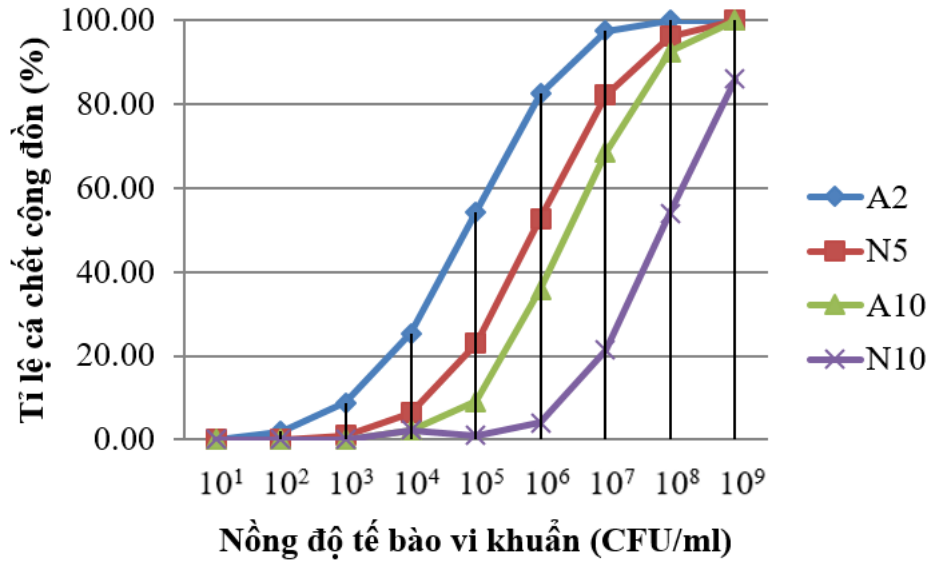
$$LD50 = 10^{(a+x)} = 10^{(7+0,57)} = 10^{7,57}$$

### N10

$10^9$	30	22	8	73,33	49	8	85,96
$10^8$	30	15	15	50,00	27	23	54,00
$10^7$	30	9	21	30,00	12	44	21,43
$10^6$	30	2	28	6,67	3	72	4,00
$10^5$	30	1	29	3,33	1	101	0,98
$10^4$	30	0	30	0,00	0	131	0,00
$10^3$	30	0	30	0,00	0	161	0,00
$10^2$	30	0	30	0,00	0	191	0,00
$10^1$	30	0	30	0,00	0	221	0,00

$$x = \frac{P_a - 50}{P_a - P_u} = \frac{54,00 - 50}{54,00 - 21,43} = 0,12$$

$$LD50 = 10^{(a+x)} = 10^{(8+0,12)} = 10^{8,12}$$



**Hình 3.9.** Biểu đồ tỷ lệ cá chết cộng dồn thí nghiệm xác định giá trị LD50 trên cá mú chấm cam gây nhiễm 4 chủng vi khuẩn A2, N5, A10 và N10

Từ bảng 3.6 và hình 3.9 cho thấy giá trị LD50 của 4 chủng vi khuẩn A2, N5, A10 và N10 lần lượt là  $10^{5.15}$ ,  $10^{6.09}$ ,  $10^{7.57}$ ,  $10^{8.12}$ . Chủng A2 có giá trị LD50 thấp nhất nên chủng A2 có khả năng gây độc mạnh nhất trong 4 chủng. Liu và cộng sự (2004) đã phân lập được 15 chủng *V. alginolyticus* từ cá giò nhiễm bệnh và đánh giá độc lực của chủng C3c01 đại diện với giá trị LD50 là  $3,28 \times 10^5$  CFU/con [84]. Đánh giá độc lực *V. alginolyticus* trên cá vược (*Dicentrarchus labrax*) và cá tráp đầu vàng (*Sparus aurata*) cho thấy giá trị LD50 giao động từ  $1,03 \times 10^5$  đến  $1,0 \times 10^6$  CFU/con [85].

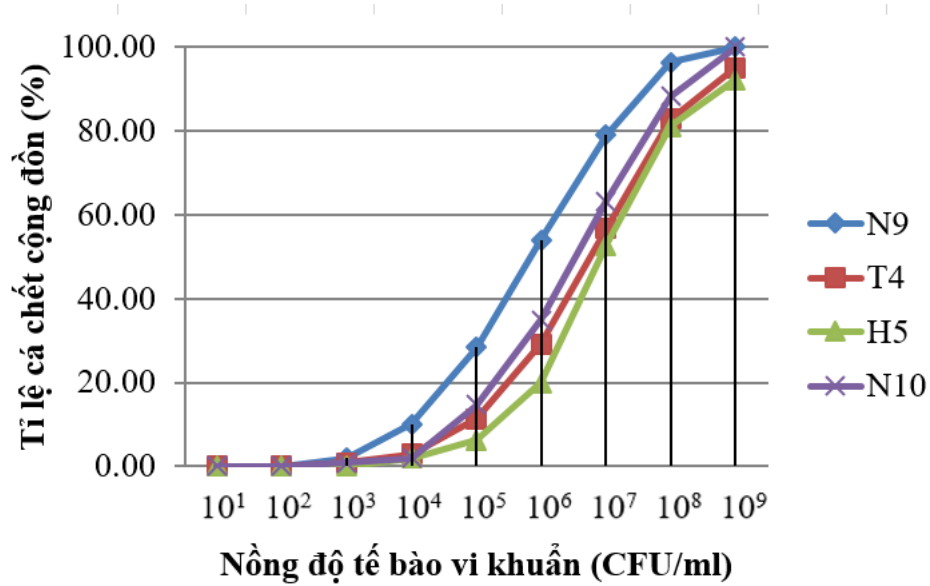
**Bảng 3.7.** Giá trị LD50 của 4 mẫu vi khuẩn thuộc loài *V. parahaemolyticus*

Nồng độ (CFU/ml)	Số lượng cá thí nghiệm (con)	Số lượng cá chết (con)	Số lượng cá sống (con)	Tỷ lệ chết (%)	Số lượng cá chết cộng dồn (con)	Số lượng cá sống cộng dồn (con)	Tỷ lệ chết cộng dồn (%)
<b>N9</b>							
$10^9$	30	30	0	100,00	100	0	100,00
$10^8$	30	27	3	90,00	80	3	96,39
$10^7$	30	19	11	63,33	53	14	79,10

$10^6$	30	15	15	50,00	34	29	53,97
$10^5$	30	11	19	36,67	19	48	28,36
$10^4$	30	6	24	20,00	8	72	10,00
$10^3$	30	2	28	6,67	2	100	1,96
$10^2$	30	0	30	0,00	0	130	0,00
$10^1$	30	0	30	0,00	0	160	0,00
$x = \frac{P_a - 50}{P_a - P_u} = \frac{53,97 - 50}{53,97 - 28,36} = 0,15$ $LD50 = 10^{(a+x)} = 10^{(6+0,15)} = 10^{6,15}$							
<b>T4</b>							
$10^9$	30	26	4	86,67	79	4	95,18
$10^8$	30	19	11	63,33	53	11	82,81
$10^7$	30	15	15	50,00	34	26	56,67
$10^6$	30	10	20	33,33	19	46	29,23
$10^5$	30	6	24	20,00	9	70	11,39
$10^4$	30	2	28	6,67	3	98	2,97
$10^3$	30	1	29	3,33	1	127	0,78
$10^2$	30	0	30	0,00	0	157	0,00
$10^1$	30	0	30	0,00	0	187	0,00
$x = \frac{P_a - 50}{P_a - P_u} = \frac{56,67 - 50}{56,67 - 29,23} = 0,24$ $LD50 = 10^{(a+x)} = 10^{(7+0,24)} = 10^{7,24}$							
<b>H5</b>							
$10^9$	30	24	6	80,00	71	6	92,21



$10^8$	30	19	11	63,33	47	11	81,03
$10^7$	30	16	14	53,33	28	25	52,83
$10^6$	30	7	23	23,33	12	48	20,00
$10^5$	30	3	27	10,00	5	75	6,25
$10^4$	30	2	28	6,67	2	103	1,90
$10^3$	30	0	30	0,00	0	133	0,00
$10^2$	30	0	30	0,00	0	163	0,00
$10^1$	30	0	30	0,00	0	193	0,00
$x = \frac{P_a - 50}{P_a - P_u} = \frac{52,83 - 50}{52,83 - 20,00} = 1,10$ $LD50 = 10^{(a+x)} = 10^{(7+1,10)} = 10^{8,10}$							
<b>QN4</b>							
$10^9$	30	30	0	100,00	90	0	100,00
$10^8$	30	22	8	73,33	60	8	88,24
$10^7$	30	16	14	53,33	38	22	63,33
$10^6$	30	11	19	36,67	22	41	34,92
$10^5$	30	7	23	23,33	11	64	14,67
$10^4$	30	3	27	10,00	4	91	4,21
$10^3$	30	1	29	3,33	1	120	0,83
$10^2$	30	0	30	0,00	0	150	0,00
$10^1$	30	0	30	0,00	0	180	0,00
$x = \frac{P_a - 50}{P_a - P_u} = \frac{63,33 - 50}{63,33 - 34,92} = 0,47$ $LD50 = 10^{(a+x)} = 10^{(7+0,47)} = 10^{7,47}$							



**Hình 3.10.** Biểu đồ tỷ lệ cá chết cộng dồn thí nghiệm xác định giá trị LD50 trên cá mú chấm cam gây nhiễm 4 mẫu vi khuẩn N9, T4, H5 và QN4

Từ bảng 3.7 và hình 3.10 cho thấy giá trị LD50 của 4 chủng vi khuẩn N9, T4, QN4 và H5 lần lượt là  $10^{6,15}$ ,  $10^{7,24}$ ,  $10^{7,47}$ ,  $10^{8,10}$ . Chủng N9 có giá trị LD50 thấp nhất nên N9 có khả năng gây độc mạnh hơn so với 3 chủng còn lại. Khouadja và cộng sự (2013) đánh giá độc lực các chủng *V. parahaemolyticus* phân lập từ cá vược nhiễm bệnh cho thấy giá trị LD50 của các chủng này dao động từ  $3,52 \times 10^4$  CFU/ml đến  $2,29 \times 10^6$  CFU/ml [86]. Tương tự, Marudhupandi và cộng sự (2017) đã phân lập *V. parahaemolyticus* gây bệnh trên cá cảnh *Amphiprion sebae* và xác định giá trị LD50 là  $1 \times 10^5$  CFU/ml [87].

Dựa trên kết quả đánh giá độc lực và giá trị LD50 cho thấy hai chủng *V. alginolyticus* A2 và *V. parahaemolyticus* N9 có tỉ lệ sống sót của cá sau khi gây nhiễm bởi hai chủng nói trên và giá trị LD50 là thấp nhất. Tiến hành, xác định trình tự gene kháng nguyên của hai chủng *V. parahaemolyticus* N9 và *V. alginolyticus* A2.

3.5. Xác định trình tự gene kháng nguyên *OmpK* và *OmpU* của chủng vi khuẩn *V. alginolyticus*

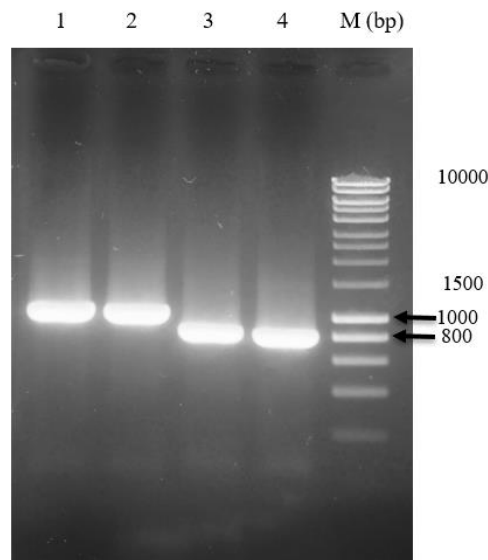
**Bảng 3.8.** Thiết kế các cặp mồi cho phản ứng PCR

Tên mồi	Trình tự	Kích thước	Nhiệt độ bắt cặp
OmpK-A2	F: TGGATCCATGCGTAAATCACTTTTAGCTC R: TAAGCTTTTAGAACTTGTAAGTTACAGCAAG	798	56

OmpU-A2	F: <u>CGGATCC</u> ATGAAAAAGACTCTAATTGCTCT R: TAAGCTTTTAGAAGTCGTAACGTAGACC	1023	56
OmpK-N9	F: TGGATCCATGCGTAAATCACTTCTAGCTC R: TAAGCTTTTAGAAGTTGTAAGTTACTGCTACG	894	56
OmpU-N9	F: TGGATCCATGAAAAAGACTCTAATTGC R: TAAGCTTAGAAGTCGTAACGTAG	1014	56

Ghi chú: trình tự gạch chân là vị trí nhận biết của enzyme BamHI và HindIII.

Tiến hành khuếch đại đoạn gene *OmpK* và *OmpU* của chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* A2 và *V. parahaemolyticus* N9 với cặp mồi đặc hiệu có gắn vị trí nhận biết của enzyme BamHI và HindIII tương ứng ở đầu 5' của mồi xuôi và mồi ngược. Sản phẩm PCR được chạy điện di kiểm tra trên gel agarose (xem hình 3.11) trước khi tiến hành giải trình tự gene.



**Hình 3.11.** Điện di sản phẩm pcr nhân gene

M: DNA ladder 10 kb (Bioline, Đức); 1: *OmpU*-A2 (~1023 bp); 2: *OmpU*-N9 (~1014 bp); 3: *OmpK*-N9 (~894 bp); 4: *OmpK*-A2 (~798 bp)

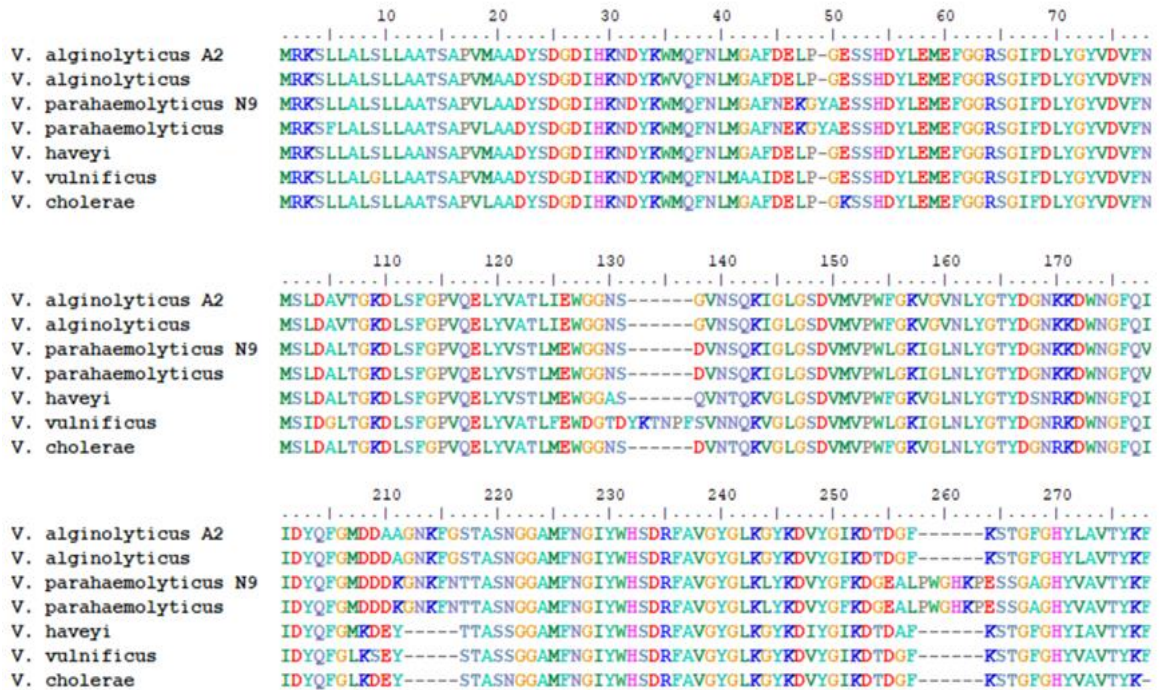
Kết quả điện di cho thấy sản phẩm PCR có một băng duy nhất với kích thước tương đương với kích thước dự đoán lý thuyết gene *OmpU* (~ 1000 bp) và gene *OmpK* (~ 800 bp) của hai vi khuẩn *V. parahaemolyticus* N9 và *V. alginolyticus* A2. Tinh sạch sản phẩm PCR và giải trình tự nucleotide. Khi so sánh đoạn trình tự nucleotide của 2 gene trên với các trình tự gene *OmpU* và gene *OmpK* trên ngân hàng gene (Genbank) bằng công cụ BLAST cho thấy sự tương đồng lên đến 99% (Kết quả so sánh trình tự gene được thể hiện ở phụ lục 3). Điều này chứng tỏ đoạn

mồi thiết kế để khuếch đại gene của chúng tôi là phù hợp, đồng thời khẳng định đã khuếch đại thành công gene *OmpU* và gene *OmpK* từ chủng vi khuẩn phân lập *V. alginolyticus* A2 và chủng *V. parahaemolyticus* N9.

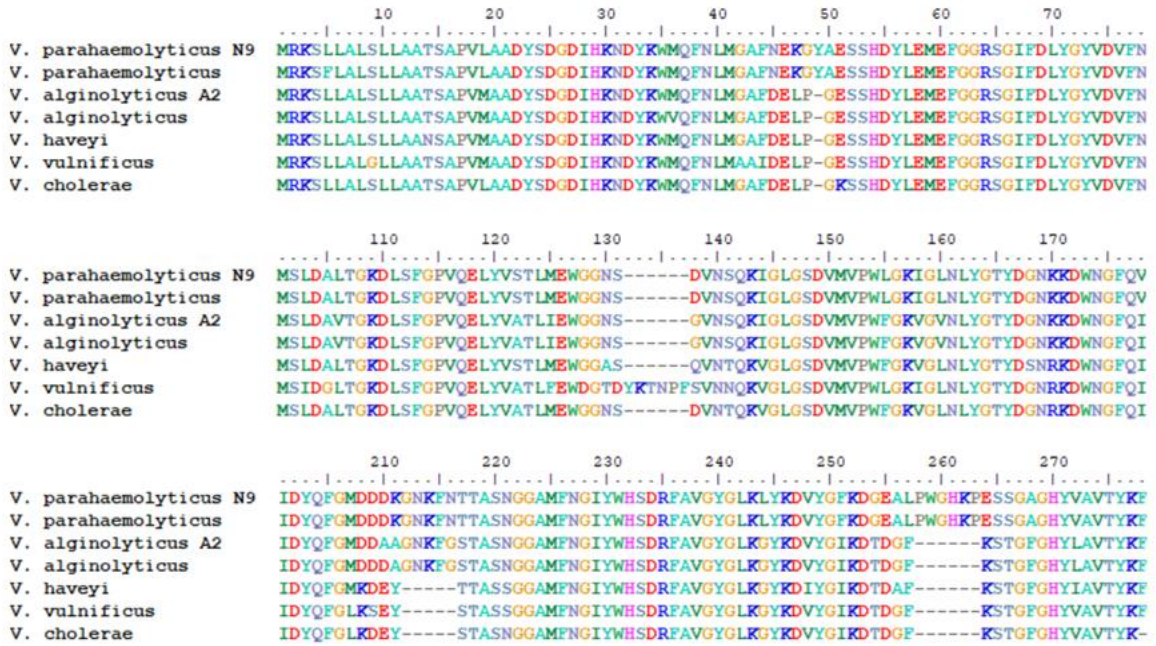
**Bảng 3.9.** Các chủng *Vibrio* dùng để so sánh mức độ tương đồng trình tự gene *OmpU* và gene *OmpK*

Gene <i>OmpK</i> của các chủng	Số genbank	Gene <i>OmpU</i> của các chủng	Số genbank
<i>V. alginolyticus</i> A2	PP350534	<i>V. alginolyticus</i> A2	PP350535
<i>V. alginolyticus</i>	ACK36938.1	<i>V. alginolyticus</i>	WP_258480795.1
<i>V. parahaemolyticus</i> N9	PP475473	<i>V. parahaemolyticus</i> N9	PP475474
<i>V. parahaemolyticus</i>	WP_140247526.1	<i>V. parahaemolyticus</i>	WP_020841237.1
<i>V. haveyi</i>	AKL71399.1	<i>V. haveyi</i>	CAK6715719.1
<i>V. vulnificus</i>	AGL46604.1	<i>V. vulnificus</i>	AIL71513.1
<i>V. cholerae</i>	WP_046127003.1	<i>V. cholerae</i>	AVK79118.1

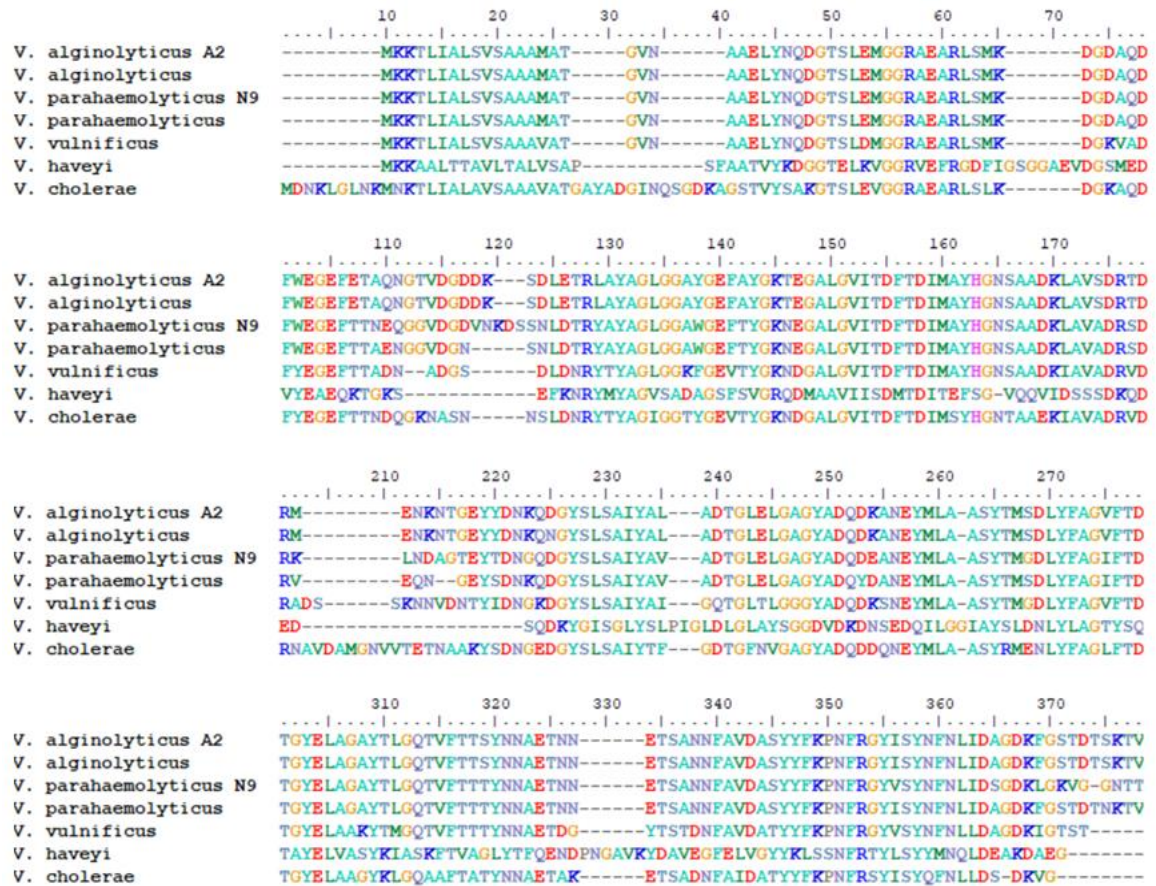
Phân tích và so sánh trình tự protein suy diễn gene *OmpK* và *OmpU* của 2 chủng *V. alginolyticus* A2 và *V. parahaemolyticus* N9 với các loài *Vibrio* khác cho thấy độ tương đồng cao giữa các loài (hình 3.12 – 3.15)



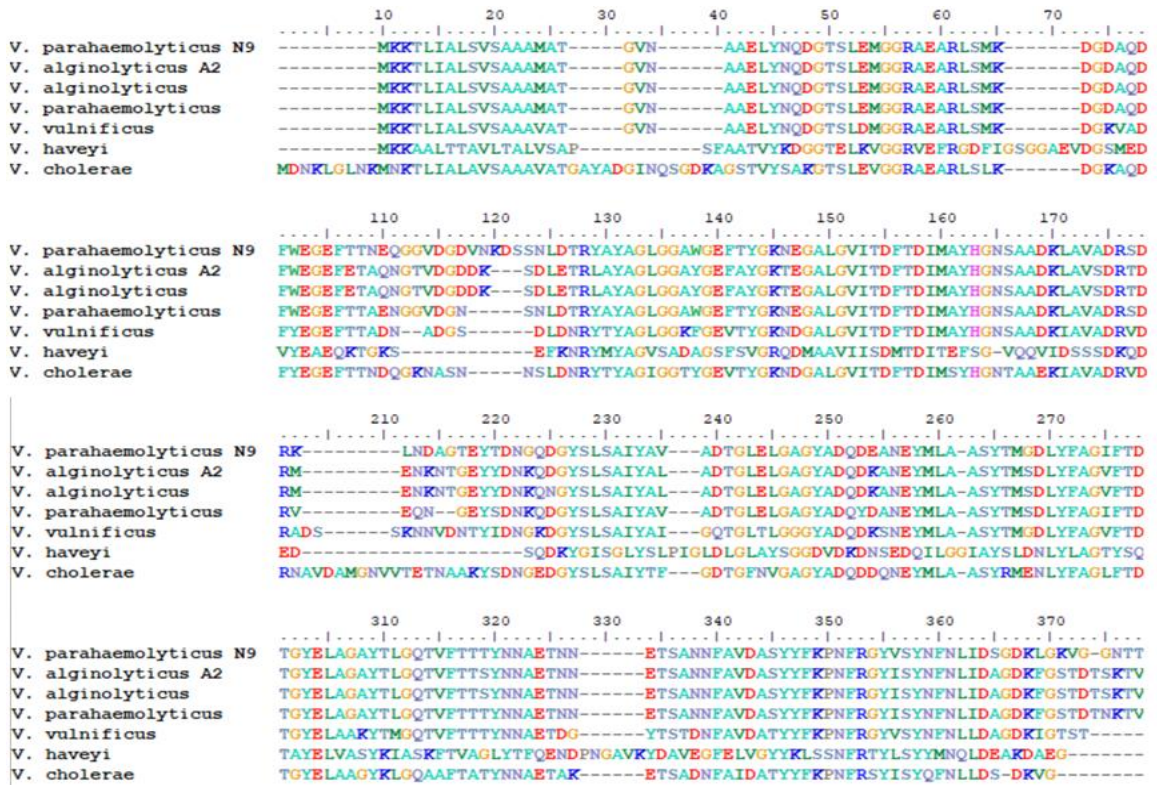
**Hình 3.12.** So sánh trình tự protein suy diễn gene *OmpK* của vi khuẩn *V. alginolyticus* A2 với gene *OmpK* của các loài *Vibrio*



Hình 3.13. So sánh trình tự protein suy diễn gene *OmpK* của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* N9 với gene *OmpK* của các loài *Vibrio*



Hình 3.14. So sánh trình tự protein suy diễn gene *OmpU* của vi khuẩn *V. alginolyticus* A2 với gene *OmpU* của các loài *Vibrio*



**Hình 3.15.** So sánh trình tự protein suy diễn gene *OmpU* của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* N9 với gene *OmpU* của các loài *Vibrio*

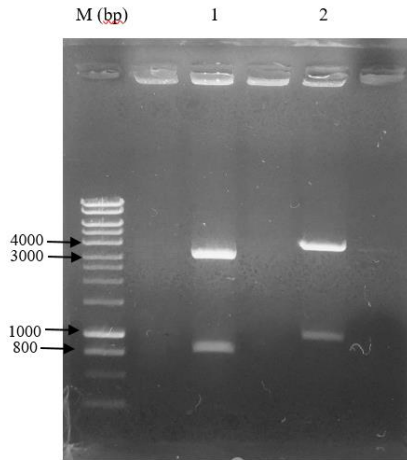
So sánh và phân tích trình tự protein suy diễn hai đoạn gene *OmpK* và *OmpU* của chủng *V. alginolyticus* A2 và *V. parahaemolyticus* N9 với các loài *Vibrio* khác trên NCBI cho thấy khả năng tương đồng cao. Kết hợp với giá trị LD50 và khả năng gây bệnh của hai chủng, gene *OmpK* và *OmpU* của chủng *V. alginolyticus* A2 được chọn làm vật liệu cho tách dòng và biểu hiện gene đích trong *E. coli*. Có thể thấy hai gene kháng nguyên của chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* A2 là ứng viên tiềm năng trong phát triển vaccine đa giá phòng bệnh Vibriosis gây ra cho động vật thủy sản.

### 3.6. Tách dòng, biểu hiện gene kháng nguyên *OmpK* và *OmpU* trong *E. coli*

#### 3.6.1. Nhân dòng gene kháng nguyên

Vector pGEM®-T (~ 3kb) được sử dụng làm vector nhân dòng cho gene *OmpK* và vector Topo pCE2 TA-Zero Cloning (~ 4kb) làm vector nhân dòng cho gene *OmpU*. Đoạn gene sau khi khuếch đại sẽ được chèn vào vector bằng enzyme T4 ligase, sau đó được biến nạp vào *E. coli* DH5 $\alpha$ . Sử dụng môi trường LB agar chứa kháng sinh ampicillin, IPTG, Xgal để sàng lọc khuẩn lạc xanh, trắng. Khuẩn lạc trắng sẽ được chọn để tách plasmid kiểm tra sự có mặt của gene đích bằng cắt plasmid với enzyme cắt giới hạn *Bam*HI và *Hind*III sau đó điện di trên gel agarose để phân tích kết quả. Kết quả chạy điện di thu được một số dòng plasmid mang

gene đích, thể hiện sản phẩm cắt gồm 2 băng đúng kích thước dự đoán là băng DNA plasmid và băng gene đích (*OmpK* và *OmpU*) (Hình 3.16).



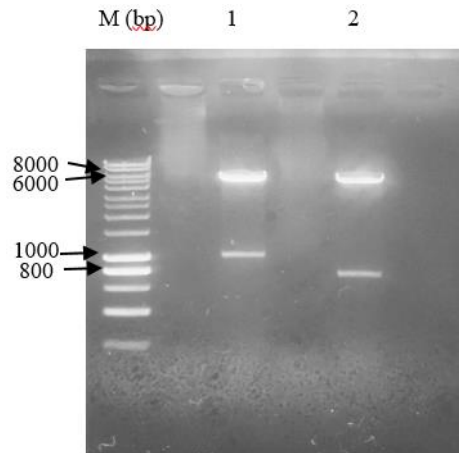
**Hình 3.16.** Kết quả điện di đại diện sản phẩm cắt plasmid tái tổ hợp pGEM-K và pCE2-U mang gene ngoại lai bằng enzyme cắt giới hạn *Bam*HI và *Hind*III  
M. DNA ladder 10 kb (Bioline); 1. Plasmid pGEM-K; 2. Plasmid pCE2-U

Để khẳng định các đoạn gene vừa được tách dòng là gene *OmpK*, *OmpU*, các plasmid mang gene ngoại lai được sử dụng làm khuôn và chạy PCR với cặp mồi đặc hiệu cho 2 gene trên và gửi đi giải trình tự nucleotide. So sánh trình tự đoạn gene được giải với trình tự gene *OmpK*, *OmpU* của chủng *V. alginolyticus* đã khuếch đại ban đầu cho thấy độ tương đồng là 100%. Kết quả này khẳng định chúng tôi đã tách dòng thành công gene *OmpK*, *OmpU* của chủng *V. alginolyticus*.

3.6.2. Thiết kế vector pET28a(+) tái tổ hợp để biểu hiện gene *OmpK*, *OmpU* trong *E. coli*

Vector tái tổ hợp mang gene *OmpK*, *OmpU* và vector pET28a(+) được cắt đồng thời bằng enzyme cắt giới hạn *Bam*HI và *Hind*III, sản phẩm sau khi cắt sẽ được chạy điện di phân tách trên gel agarose, sau đó các băng DNA tương ứng băng DNA của vector pET28a(+) và gene đích *OmpK*, *OmpU* được tinh sạch bằng gel extraction kit (Intron, Hàn Quốc). Gene đích *OmpK*, *OmpU* sau tinh sạch sẽ lần lượt được gắn vào vector pET28a(+) tạo vector tái tổ hợp pET-*OmpK* và pET-*OmpU* như mô tả ở phần phương pháp. Vi khuẩn sau khi biến nạp với vector tái tổ hợp được cấy trên đĩa LB agar có bổ sung kháng sinh kanamycin (50 µg/ml). Các khuẩn lạc mang gene đích *OmpK*, *OmpU* sẽ được chọn lọc bằng phản ứng clony PCR với cặp mồi đặc hiệu cho *OmpK* và *OmpU*. Các dòng plasmid cho kết quả PCR với kích thước tương đương kích thước gene *OmpK*, *OmpU* sẽ được tiếp tục phân tích bằng cắt kiểm tra với 2 enzyme cắt giới hạn là *Bam*HI và *Hind*III để

chọn lọc các plasmid tái tổ hợp mang gene đích. Sản phẩm cắt được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Kết quả được thể hiện ở hình 3.17



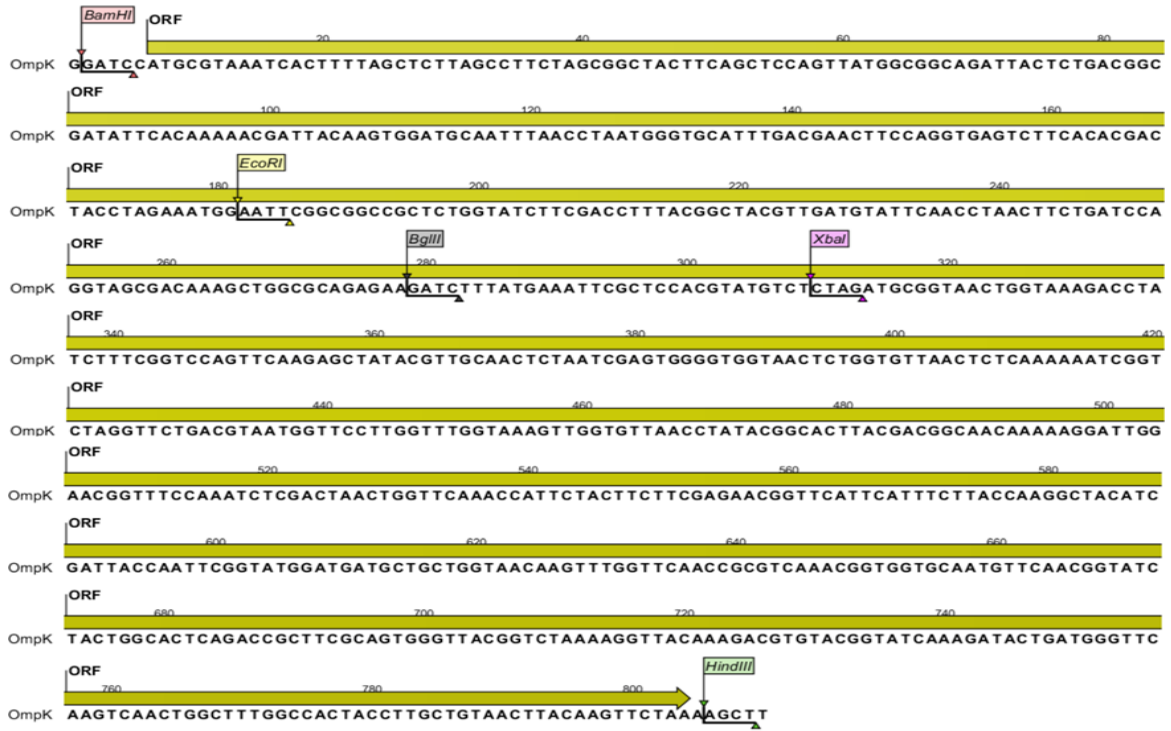
**Hình 3.17.** Kết quả điện di sản phẩm cắt các plasmid pET28a(+) tái tổ hợp mang gene kháng nguyên *OmpK*, *OmpU* sau khi xử lý bằng *Bam*HI và *Hind*III

M. DNA ladder 10 kb; 1. Plasmid pET-*OmpU*; 2. Plasmid pET-*OmpK*

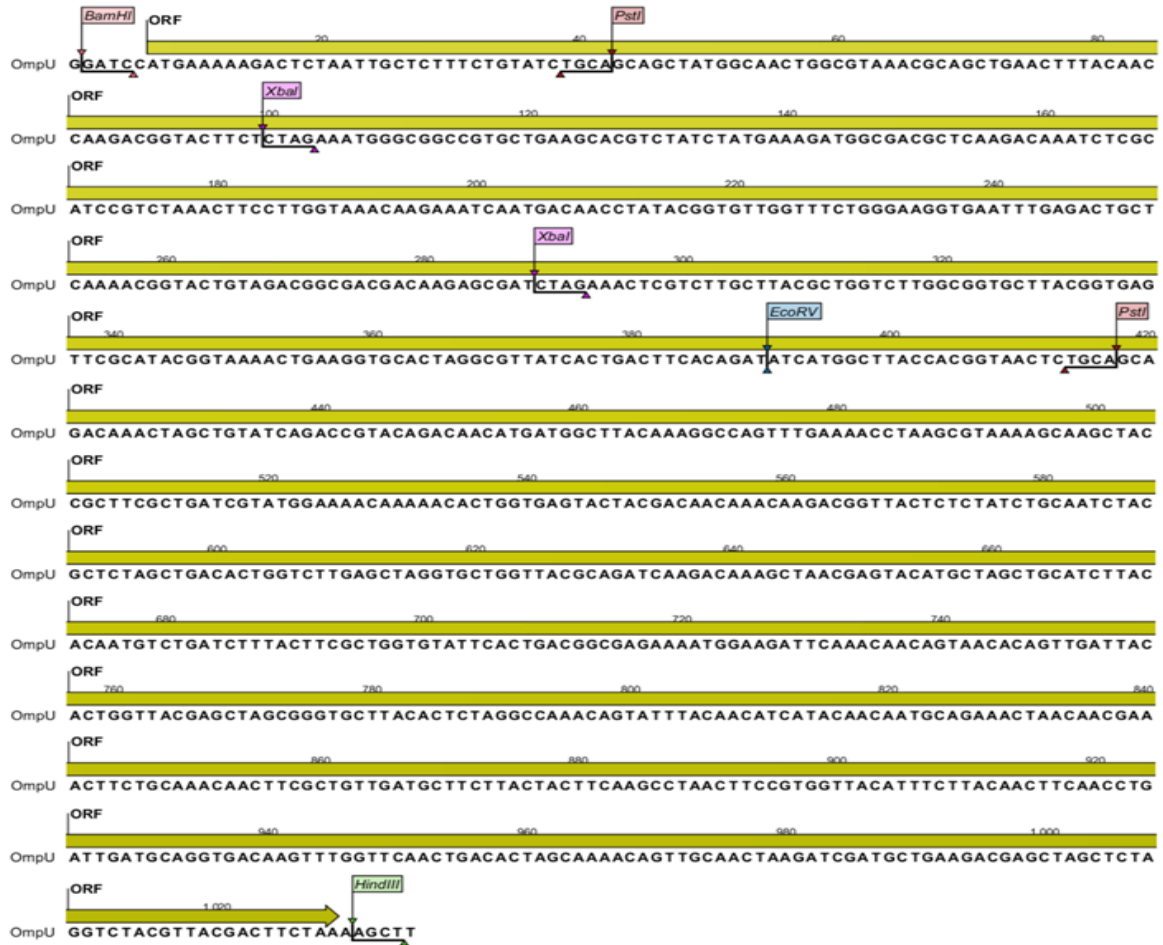
Kết quả chúng tôi đã chọn được 1 số dòng plasmid tái tổ hợp pET28a(+) mang gene *OmpK*, *OmpU* thể hiện sản phẩm cắt thành 2 đoạn tương ứng với 2 băng có kích thước vector pET28a(+) là 5369 bp, hai băng bên dưới có kích thước khoảng 1000 bp (giếng 1, gene *OmpU*) và 800 bp (giếng 2, gene *OmpK*).

Trước khi tiến hành biểu hiện gene, các gene ngoại lai trong plasmid pET28a(+) tái tổ hợp trên được giải trình tự. Phân tích kết quả giải trình tự gene cũng cho thấy đoạn gene đã được chèn vào vector pET28a(+) đúng là gene *OmpK*, *OmpU* và các gene này được gắn đúng chiều, đúng khung đọc mở, không có mã kết thúc trong gene, đảm bảo cho việc biểu hiện gene. Kết quả thể hiện ở hình 3.18 và 3.19.





Hình 3.18. Trình tự nucleotide và vùng đọc mở gene *OmpK*

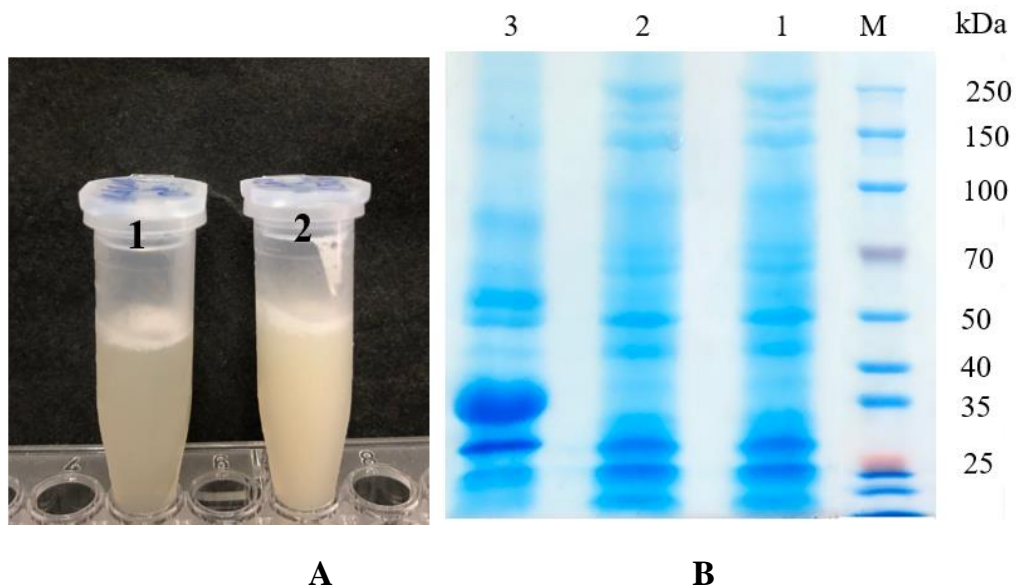


Hình 3.19. Trình tự nucleotide và vùng đọc mở gene *OmpU*

Đoạn gene *OmpK* có kích thước gồm 798 nucleotide mã hóa cho protein gồm 266 amino acid với trọng lượng phân tử ~ 34 kDa. Đoạn gene *OmpU* có kích thước gồm 1023 nucleotide mã hóa cho protein gồm 341 amino acid với trọng lượng phân tử ~ 42 kDa.

### 3.6.3. Kết quả biểu hiện và tinh sạch OmpK và OmpU trong *E. coli* BL21 (DE3)

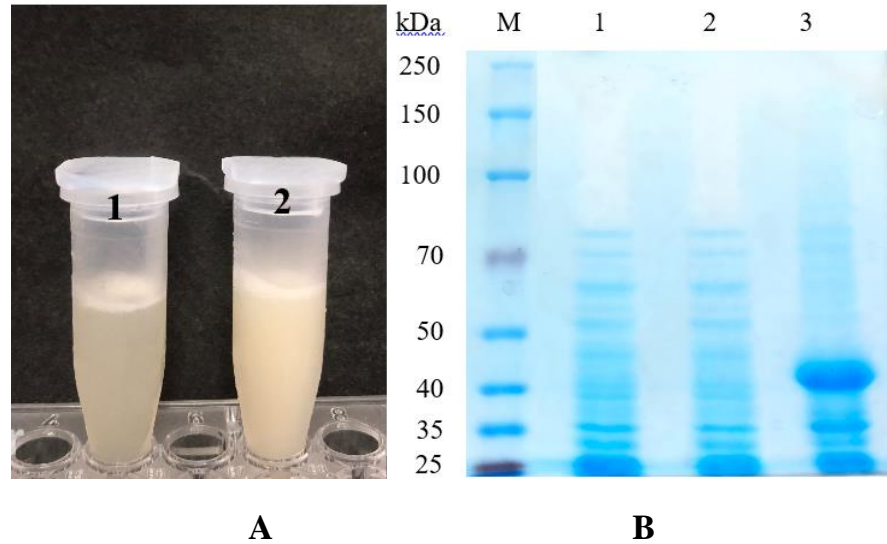
Ưu điểm của *E. coli* BL21 (DE3) là hạn chế sự phân cắt của protease đối với protein ngoại lai, ổn định protein ngoại lai trong tế bào sau khi được tổng hợp. Vector OmpK và OmpU được biến nạp vào *E. coli* BL21 (DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt. Dịch biến nạp sau khi biến nạp được cấy trên môi trường LB đặc có bổ sung Kanamycine (50 µg/ml) và nuôi ở tủ ấm 37° C qua đêm. Chọn một khuẩn lạc trắng riêng rẽ nuôi qua đêm trong môi trường LB có bổ sung kanamycine với nồng độ cuối cùng là 50 µg/ml, 180 vòng/phút ở 37°. Chuyển dịch nuôi cấy (2%) sang môi trường LB lỏng mới có bổ sung kanamycine (50 µg/ml) và nuôi lắc cho đến khi OD<sub>600</sub> đạt 0,6 – 0,8 (trong 3 giờ), sau đó bổ sung IPTG nồng độ cuối cùng 1mM. Sau cảm ứng 5 giờ, protein tổng số từ tế bào được điện di kiểm tra trên gel polyacrylamide. Kết quả biểu hiện được thể hiện ở hình 3.20 và 3.21.



**Hình 3.20.** Kết quả biểu hiện OmpK. A. Dịch protein tổng số từ mẫu không cảm ứng (1) và mẫu được cảm ứng IPTG (2)

B. Kết quả điện di protein tổng số từ mẫu được cảm ứng với IPTG

M. Thang protein chuẩn 1. Chủng BL21 kiểu dại cảm ứng với IPTG, 2. Chủng tái tổ hợp không cảm ứng IPTG 1mM, 3. Chủng tái tổ hợp cảm ứng IPTG (1mM).



**Hình 3.21.** Kết quả biểu hiện OmpU

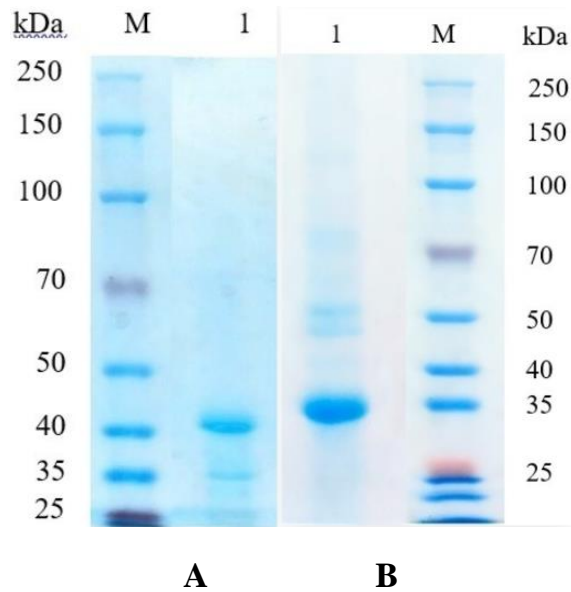
A. Dịch protein tổng số từ mẫu không cảm ứng (1) và mẫu được cảm ứng IPTG (2)

B. Kết quả điện di protein tổng số từ mẫu được cảm ứng với IPTG

M. Thang protein chuẩn 1. Chủng BL21 kiểu dại cảm ứng IPTG (1mM), 2. Chủng tái tổ hợp không cảm ứng IPTG (1mM), 3. Chủng tái tổ hợp cảm ứng với IPTG (1mM).

Kết quả điện di (hình 3.20B và 3.21B) cho thấy mẫu sau cảm ứng IPTG (giếng 3) xuất hiện băng protein khác biệt có kích thước xấp xỉ 34 kDa (hình 3.20B) và 42 kDa (hình 3.21B), tương đương với kích thước của protein OmpK và OmpU theo tính toán lý thuyết. Trong khi đó, mẫu *E. coli* BL21 và mẫu không cảm ứng không xuất hiện băng protein này. Điều này chứng tỏ protein tái tổ hợp có thể đã được biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3).

Để phục vụ cho mục đích nghiên cứu tiếp theo chúng tôi tiến hành tinh sạch sản phẩm protein tái tổ hợp. Sử dụng hệ thống Probond Nickel – Chelating Resin (Invitrogen) tinh sạch protein tái tổ hợp thể hòa tan. Quá trình tinh sạch được tiến hành theo hướng dẫn nhà sản xuất. Imidazole được sử dụng trong quá trình tinh sạch như chất cạnh tranh  $\text{Ni}^{2+}$  trong phức hợp của  $\text{Ni}^{2+}$  và histidin của protein tái tổ hợp. Do 6 histidin nằm ở đầu N trên phân tử protein tái tổ hợp làm tăng liên kết với  $\text{Ni}^{2+}$ . Khi đó, các protein không đặc hiệu bị rửa trôi hầu hết với nồng độ 500 mM imidazole. Kết quả tinh sạch được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE (hình 3.22). Các protein OmpK và OmpU tái tổ hợp có độ tinh sạch cao khoảng (~ 95%), ít lẫn các protein của tế bào vật chủ. Protein tái tổ hợp sau tinh sạch được thẩm tích trong đệm bảo quản (10 mM Tris-HCl pH 8,0 và 50 mM NaCl), sau đó chia nhỏ vào các ống eppendorf và bảo quản ở  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Hình 3.22.** Kết quả tinh sạch protein OmpU (A) và OmpK (B)

A. Điện di protein OmpU tinh sạch

M. Thang chuẩn protein; 1. Protein OmpU

B. Điện di protein OmpK tinh sạch

M. Thang chuẩn protein; 1. Protein OmpK

### 3.7. Đánh giá khả năng tạo đáp ứng miễn dịch của protein tái tổ hợp ở cá mú

Cá mú chấm cam (*E. coioides*) được tiêm protein tái tổ hợp OmpK và OmpU với liều lượng 100  $\mu$ l/con, với nồng độ 1 mg/ml vào phúc mạc dưới da như mô tả ở phần phương pháp nghiên cứu. Liều lượng protein tiêm cá mú chấm cam được tiến hành theo một số nghiên cứu trước đó của các tác giả [16,88]

Sau 14 ngày tiêm vaccine lần 2, cá mú chấm cam được tiêm công cường độ ở liều 100LD50 bằng chủng đại *V. parahaemolyticus* N9 ( $1,4 \times 10^7$  CFU/con) và *V. alginolyticus* A2 ( $1,4 \times 10^6$  CFU/con). Tỷ lệ cá chết được ghi nhận khi tiêm protein OmpK và OmpU và cảm nhiễm với chủng *V. parahaemolyticus* N9 tương ứng là 27,78% và 35,56%. Đối với cá mú chấm cam cảm nhiễm chủng *V. alginolyticus* A2 tỷ lệ cá chết là 17,78% và 18,89%. Đối với cá tiêm PBS tỷ lệ chết là 100% khi gây nhiễm *V. parahaemolyticus* N9 và *V. alginolyticus* A2. Tỷ lệ bảo hộ (RPS) tương ứng đối với cá được tiêm protein OmpK là 72,22% khi được công cường độ bằng chủng *V. parahaemolyticus* N9; 88,89% khi công cường độ với chủng *V. alginolyticus* A2. Đối với cá tiêm protein OmpU, khi công cường độ với chủng *V. parahaemolyticus* N9 có tỷ lệ bảo hộ 64,44% và 82,22% khi công cường độ với chủng *V. alginolyticus* A2. Kết quả được thể hiện trong bảng 3.10. Kết quả trong

ngiên cứu này cũng khá tương đồng với kết quả nghiên cứu của các tác giả trước.

**Bảng 3.10.** Đáp ứng miễn dịch của cá mú chấm cam sau khi tiêm protein tái tổ hợp mang gene kháng nguyên sau 45 ngày

Xử lý	Tỷ lệ cá chết (%) sau 45 dpv* (Nồng độ khuẩn 100LD50)		RPS (%) sau 45 dpv*	
	V. <i>parahaemolyticus</i> N9	V. <i>alginolyticus</i> A2	V. <i>parahaemolyticus</i> N9	V. <i>alginolyticus</i> A2
PBS	100,00	100,00		
OmpK	27,78	17,78	72,22	88,89
OmpU	35,56	18,89	64,44	82,22

\* *Days post vaccination/ ngày tiêm vaccine.*

Mao và cộng sự (2007) đánh giá khả năng bảo hộ vaccine tái tổ hợp của hai protein mang gene kháng nguyên *psuA* và *pvuA* ở *V. parahemolyticus* zj2003 với tỷ lệ bảo hộ trên cá lù đù vàng khi tiêm vaccine chứa protein tái tổ hợp mang gene *psuA*, *pvuA* và *psuA* kết hợp *pvuA* tương ứng 50%, 62,5%, 75% [89]. Qian và cộng sự (2007) cũng sử dụng protein tái tổ hợp OmpK phân lập từ *V. alginolyticus* ZJ04107 cho tỷ lệ bảo hộ 70,4% đến 79,2% với chủng *V. alginolyticus*. Khi so sánh trình tự amino acid protein OmpK của chủng *V. alginolyticus* ZJ04107 với loài *Vibrio* khác cho thấy độ tương đồng khá cao: *V. parahaemolyticus* (DQ016304; 81,2%), *V. vulnificus* (AE016795; 75,2%), *V. cholerae* (AE004301; 73,7%), *V. haveyi* (DQ279076; 78,1%). Tương tự, Nehlah và cộng sự đã tạo vaccine tái tổ hợp sử dụng protein màng ngoài OmpK và OmpW của *V. alginolyticus*. Các tác giả tiêm cá mú nghệ và cá mú cạp với 0,5 ml/con protein OmpK tái tổ hợp (ở liều thứ nhất và liều tăng cường), sau đó lây nhiễm với *V. alginolyticus* ( $10^9$  CFU/ml), kết quả vaccine tái tổ hợp sử dụng OmpK cho tỷ lệ bảo hộ 100%. Nhóm được tiêm vaccine OmpW có tỷ lệ 63%, thấp hơn so với nhóm tiêm vaccine OmpK [90]. Trong một nghiên cứu khác, khi đánh giá khả năng tạo miễn dịch bảo hộ của vaccine tái tổ hợp sử dụng protein OmpU của *V. alginolyticus* ở cá hồng, Cai và cộng sự đã đánh giá tỷ lệ bảo hộ đạt 96,43 [88].

Kết quả bước đầu của chúng tôi đã chỉ ra rằng OmpK và OmpU của chủng *V. alginolyticus* A2 là ứng viên tiềm năng trong phát triển vaccine đa giá phòng bệnh do *Vibrio* spp. gây ra trên cá mú chấm cam.

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

1. Đã phân lập được 22 chủng *Vibrio* trong đó gồm 12 chủng *V. alginolyticus*, 10 chủng *V. parahaemolyticus* từ nước nuôi thủy sản và cá bệnh tại 5 địa điểm thuộc khu vực miền Bắc Việt Nam: Nam Định, Ninh Bình, Thái Bình, Hải Phòng và Quảng Ninh. Đánh giá đặc điểm sinh hóa, đặc tính kháng kháng sinh của 22 chủng vi khuẩn phân lập.
2. Đã định danh được 4 chủng *V. parahaemolyticus* và 4 chủng *V. alginolyticus* bằng gene 16S rRNA
3. Đã xác định được liều LD50 của các chủng phân lập và lựa chọn được 2 chủng có LD50 thấp nhất là chủng *V. alginolyticus* A2 và chủng *V. parahaemolyticus* N9 phục vụ cho nghiên cứu tách dòng gene *OmpK* và *OmpU* và sử dụng làm chủng công cường độc.
4. Tách dòng biểu hiện và tinh sạch thành công protein OmpK và OmpU tái tổ hợp từ chủng phân lập *V. alginolyticus* A2 trong vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3).
5. Thử nghiệm bước đầu cho thấy, cá mú chấm cam khi được gây miễn dịch với protein OmpK tái tổ hợp cho tỷ lệ bảo hộ với *V. alginolyticus* A2 88,89%, với *V. parahaemolyticus* là 72,22%. Đối với nhóm được tiêm protein OmpU tỷ lệ bảo hộ là 64,44% khi công cường độc với chủng *V. parahaemolyticus* N9 và 82,22% khi công cường độc với chủng *V. alginolyticus* A2.

### KIẾN NGHỊ

1. Cần tiếp tục đánh giá khả năng bảo hộ của OmpK và OmpU tái tổ hợp trên các đối tượng khác ngoài cá mú tại các vùng ven biển phía Bắc.
2. Nghiên cứu lựa chọn và thử nghiệm phối trộn protein tái tổ hợp OmpK và OmpU với các tác chất khác nhau để nâng cao tính ổn định và hiệu quả bảo hộ của vaccine tái tổ hợp.

## DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

### Các bài báo đã công bố

Ngô Thị Huyền, Vũ Xuân Nghị, Lê Đăng Lâm Oanh, Lê Thị Tuyết Mai, Phạm Thị Tâm, Đồng Văn Quyền, Vũ Thị Bích Huyền (2022). Tính kháng kháng sinh của *Vibrio* spp. Phân lập từ nước nuôi thủy sản ở một số khu vực miền Bắc Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên* 113 (1C): 83 – 93.

### Trình tự gene công bố trên NCBI

- Gene *OmpK* của chủng *V. alginolyticus* A2 với số hiệu PP350534
- Gene *OmpU* của chủng *V. alginolyticus* A2 với số hiệu PP350535
- Gene *OmpK* của chủng *V. parahaemolyticus* N9 với số hiệu PP475473
- Gene *OmpU* của chủng *V. parahaemolyticus* N9 với số hiệu PP475474
- Gene 16S rRNA của chủng *V. parahaemolyticus* N9 với số hiệu PP404004
- Gene 16S rRNA của chủng *V. alginolyticus* A2 với số hiệu PP403904

## DANH MỤC CÁC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. National Institute for Finance Available at: [https://mof.gov.vn/webcenter/portal/vclvcstc/pages\\_r/1/chi-tiet-tin?dDocName=UCMTMP125226](https://mof.gov.vn/webcenter/portal/vclvcstc/pages_r/1/chi-tiet-tin?dDocName=UCMTMP125226).
2. Tổng cục thủy sản > Tin tức > Tin vắn Available at: <https://tongcucthuysan.gov.vn/vi-vn/tin-tuc/-tin-van/doc-tin/016636/2022-01-04/Banner 003>.
3. Tổng quan ngành Available at: <https://vasep.com.vn/gioi-thieu/tong-quan-nganh>.
4. Tổng cục thủy sản > Nuôi trồng thủy sản > Phòng chống dịch bệnh Available at: <https://tongcucthuysan.gov.vn/vi-vn/nuoi-trong-thuy-san/-phong-chong-dich-benh/doc-tin/017384/2022-05-20/dich-benh-thuy-san-tiep-tuc-duoc-kiem-soat>.
5. Egidius E (1987) Vibriosis: Pathogenicity and pathology. A review. *Aquaculture* 67: 15–28.
6. Joseph SW, Colwell RR, Kaper JB (1982) *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic Vibrios. *Crit Rev Microbiol* 10: 77–124.
7. Balebona MC, Andreu MJ, Bordas MA, và c.s. (1998) Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Appl Environ Microbiol* 64: 4269–4275.
8. Nelson JS, Grande TC, Wilson MVH (2016) Fishes of the World: Fifth Edition. *Fishes World Fifth Ed* 1–707.
9. Laining A, Rachmansyah, Ahmad T, và c.s. (2003) Apparent digestibility of selected feed ingredients for humpback grouper, *Cromileptes altivelis*. *Aquaculture* 218: 529–538.
10. Han F, Walker RD, Janes ME, và c.s. (2007) Antimicrobial Susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* Isolates from Louisiana Gulf and Retail Raw Oysters. *Appl Environ Microbiol* 73: 7096.
11. Mo WY, Chen Z, Leung HM, và c.s. (2017) Application of veterinary antibiotics in China's aquaculture industry and their potential human health risks. *Environ Sci Pollut Res Int* 24: 8978–8989.
12. Defoirdt T, Sorgeloos P, Bossier P (2011) Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr Opin Microbiol* 14: 251–258.
13. Sivasankar P, Riji John K, Rosalind George M, và c.s. (2017) Prophylactics in shrimp aquaculture health management: A review. ~ 1049 ~ *J Entomol Zool Stud* 5.
14. Ji Q, Wang S, Ma J, và c.s. (2020) A review: Progress in the development of fish *Vibrio* spp. vaccines. *Immunol Lett* 226: 46–54.
15. Cai SH, Yao SY, Lu YS, và c.s. (2010) Immune response in *Lutjanus erythropterus* induced by the major outer membrane protein (OmpU) of *Vibrio alginolyticus*. *Dis Aquat Organ* 90: 63–68.



16. Qian RH, Xiao ZH, Zhang CW, và c.s. (2008) A conserved outer membrane protein as an effective vaccine candidate from *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture* 278: 5–9.
17. Ranjan R *Epinephelus coioides* (Hamilton, 1822).
18. Randall J, Heemstra P (1991) Revision of Indo-Pacific groupers (perciformes:serranidae: epinephelinae) with descriptions of five new species.
19. Pierre S, Gaillard S, Prévot-D'Alvise N, và c.s. (2008) Grouper aquaculture: Asian success and Mediterranean trials. *Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst* 18: 297–308.
20. Thủy sản năm 2023: Sản lượng nuôi trồng vượt chỉ tiêu, xuất khẩu không hoàn thành kế hoạch - Nhịp sống kinh tế Việt Nam & Thế giới Available at: <https://vneconomy.vn/thuy-san-nam-2023-san-luong-nuoi-trong-vuot-chi-tieu-xuat-khau-khong-hoan-thanh-ke-hoach.htm>.
21. Tucker JW (1998) Grouper Culture. *Am Fish Soc Symp* 2005: 423–448.
22. Báo cáo khoa học: Tình hình nuôi cá mú ở Việt Nam: hiện trạng và các trở ngại về mặt kỹ thuật.
23. Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo MS (2010) Molecular studies, disease status and prophylactic measures in grouper aquaculture: Economic importance, diseases and immunology. *Aquaculture* 309: 1–14.
24. Hegde A, Chen CL, Qin QW, và c.s. (2002) Characterization, pathogenicity and neutralization studies of a nervous necrosis virus isolated from grouper, *Epinephelus tauvina*, in Singapore. *Aquaculture* 213: 55–72.
25. Anand P, Sobhana K, George KC, và c.s. (2008) Phenotypic characteristics and antibiotic sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from diseased groupers (*Epinephelus* spp.). *J Mar Biol Assoc India*.
26. Hernández-Robles MF, Álvarez-Contreras AK, Juárez-García P, và c.s. (2016) Virulence factors and antimicrobial resistance in environmental strains of *Vibrio alginolyticus*. *Int Microbiol* 19: 191–198.
27. Baker-Austin C, Trinanes J, Gonzalez-Escalona N, và c.s. (2017) Non-Cholera Vibrios: The Microbial Barometer of Climate Change. *Trends Microbiol* 25: 76–84.
28. Kersters K, De Ley J. (1984) Bergey's manual of systematic bacteriology , Baltimore, MD :, Williams & Wilkins,.
29. Karunasagar I (2014) Bacteria: *Vibrio vulnificus*. *Encycl Food Saf* 1: 564–569.
30. Fujino T, Okuno Y, Nakada D, và c.s. (1953) On the Bacteriological Examination of Shirasu-Food Poisoning. *Med J Osaka Univ* 4: 299–304.
31. Thước TL (2009) Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm, Nxb Giáo dục.
32. Su YC, Duan J, Wu WH (2005) Selectivity and specificity of a chromogenic medium for detecting *Vibrio parahaemolyticus*. *J Food Prot* 68: 1454–1456.

33. Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, và c.s. (2007) Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clin Microbiol Rev* 20: 39–48.
34. Okuda J, Nishibuchi M (1998) Manifestation of the Kanagawa phenomenon, the virulence-associated phenotype, of *Vibrio parahaemolyticus* depends on a particular single base change in the promoter of the thermostable direct haemolysin gene. *Mol Microbiol* 30: 499–511.
35. Kaneko T, Colwell RR (1975) Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Appl Microbiol* 30: 251.
36. BEUCHAT LR (1975) Environmental Factors Affecting Survival and Growth of *Vibrio parahaemolyticus*. A Review. *J Milk Food Technol* 38: 476–480.
37. Wong HC, Chen MC, Liu SH, và c.s. (1999) Incidence of highly genetically diversified *Vibrio parahaemolyticus* in seafood imported from Asian countries. *Int J Food Microbiol* 52: 181–188.
38. Liu J, Qin K, Wu C, và c.s. (2021) De Novo Sequencing Provides Insights Into the Pathogenicity of Foodborne *Vibrio parahaemolyticus*. *Front Cell Infect Microbiol* 11: 397.
39. Kim S, Chung HY, Lee DH, và c.s. (2016) Complete genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain FORC\_008, a foodborne pathogen from a flounder fish in South Korea. *Pathog Dis* 74.
40. Letchumanan V, Ser HL, Tan WS, và c.s. (2016) Genome Sequence of *Vibrio parahaemolyticus* VP152 Strain Isolated from *Penaeus indicus* in Malaysia. *Front Microbiol* 7.
41. Pang Y, Guo X, Tian X, và c.s. (2019) Developing a novel molecular serotyping system based on capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Vibrio parahaemolyticus*. *Int J Food Microbiol* 309: 108332.
42. Chen M, Guo D, Wong HC, và c.s. (2012) Development of O-serogroup specific PCR assay for detection and identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *Int J Food Microbiol* 159: 122–129.
43. Shyne Anand PS, Sobhana KS, George KC, và c.s. (2016) Selection of specific cell wall antigen for rapid detection of fish pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* by enzyme immunoassay.
44. Li Y, Xie X, Shi X, và c.s. (2014) *Vibrio parahaemolyticus*, Southern Coastal Region of China, 2007–2012. *Emerg Infect Dis* 20: 685.
45. Dong H, Xiang Q, Gu Y, và c.s. (2014) Structural basis for outer membrane lipopolysaccharide insertion. *Nat* 2014 5117507 511: 52–56.
46. Zha Z, Li C, Li W, và c.s. (2016) LptD is a promising vaccine antigen and potential immunotherapeutic target for protection against *Vibrio* species infection. *Sci Reports* 2016 61 6: 1–13.
47. Snoussi M, Emira AE, Ae N, và c.s. Distribution of some virulence related-properties of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from Mediterranean seawater (Bay of Khenis, Tunisia): investigation of eight *Vibrio cholerae*

virulence genes.

48. Oh EG, Son KT, Yu H, và c.s. (2011) Antimicrobial Resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* Strains Isolated from Farmed Fish in Korea from 2005 through 2007. *J Food Prot* 74: 380–386.
49. Molitoris E, Joseph SW, Krichevsky MI, và c.s. (1985) Characterization and distribution of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Indonesia. *Appl Environ Microbiol* 50: 1388–1394.
50. Khuntia CP, Das BK, Samantaray BR, và c.s. (2008) Characterization and pathogenicity studies of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from diseased freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquac Res* 39: 301–310.
51. Ulitzur S (1974) *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*: Short generation-time marine bacteria. *Microb Ecol* 1: 127–135.
52. Farid AF, Larsen JL (1981) Growth of *Vibrio alginolyticus*: Interacting effects on pH, temperature, salt concentration, and incubation time. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene I Abteilung Originale Allgemeine Angewandte und Ökologische Mikrobiologie* 2: 68–75.
53. Gjerde J, Bøe B (1981) Isolation and Characterization of *Vibrio Alginolyticus* and *Vibrio parahemolyticus* from the Norwegian Coastal Environment. *Acta Vet Scand* 22: 331–343.
54. Chibani CM, Roth O, Liesegang H, và c.s. (2020) Genomic variation among closely related *Vibrio alginolyticus* strains is located on mobile genetic elements. *BMC Genomics* 21: 1DUMM.
55. Deng Y, Chen C, Zhao Z, và c.s. (2016) Complete Genome Sequence of *Vibrio alginolyticus* ZJ-T. *Genome Announc* 4: 912–928.
56. Wang P, Wen Z, Li B, và c.s. (2016) Complete genome sequence of *Vibrio alginolyticus* ATCC 33787(T) isolated from seawater with three native megaplasmids. *Mar Genomics* 28: 45–47.
57. Gram-Negative Outer Membrane - Biology LibreTexts Available at: [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology\\_\(Boundless\)/04%3A\\_Cell\\_Structure\\_of\\_Bacteria\\_Archaea\\_and\\_Eukaryotes/4.04%3A\\_Cell\\_Walls\\_of\\_Prokaryotes/4.4B%3A\\_Gram-Negative\\_Outer\\_Membrane](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_(Boundless)/04%3A_Cell_Structure_of_Bacteria_Archaea_and_Eukaryotes/4.04%3A_Cell_Walls_of_Prokaryotes/4.4B%3A_Gram-Negative_Outer_Membrane).
58. Gan L, Chen S, Jensen GJ (2008) Molecular organization of Gram-negative peptidoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 18953–18957.
59. Ganie HA, Choudhary A, Baranwal S (2022) Structure, regulation, and host interaction of outer membrane protein U (OmpU) of *Vibrio* species. *Microb Pathog* 162: 105267.
60. Lv T, Dai F, Zhuang Q, và c.s. (2020) Outer membrane protein OmpU is related to iron balance in *Vibrio alginolyticus*. *Microbiol Res* 230: 126350.
61. Li YD, Ren HL, Lu SY, và c.s. (2010) Cloning, Expression, and Genus-Specificity Analysis of 28-kDa OmpK from *Vibrio alginolyticus*. *J Food Sci* 75: M198–M203.

62. Qian R, Xiao Z, Zhang C, và c.s. (2008) Expression and purification of two major outer membrane proteins from *Vibrio alginolyticus*. *World J Microbiol Biotechnol* 24: 245–251.
63. Silvaraj S, Yasin ISM, Karim MMA, và c.s. (2020) Elucidating the Efficacy of Vaccination against Vibriosis in Lates calcarifer Using Two Recombinant Protein Vaccines Containing the Outer Membrane Protein K (r-OmpK) of *Vibrio alginolyticus* and the DNA Chaperone J (r-DnaJ) of *Vibrio harveyi*. *Vaccines* 2020, Vol 8, Page 660 8: 660.
64. Li N, Yang Z, Bai J, và c.s. (2010) A shared antigen among *Vibrio* species: Outer membrane protein-OmpK as a versatile Vibriosis vaccine candidate in Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish Shellfish Immunol* 28: 952–956.
65. Lun J, Zhang S, Dong Y, và c.s. (2016) [Immunological cross-reactivity and cross-protection of outer membrane protein OmpU among *Vibrio* species]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 56: 867–879.
66. Da F, Wan X, Lin G, và c.s. (2023) Characterization of fliR-deletion mutant  $\Delta$ fliR from *Vibrio alginolyticus* and the evaluation as a live attenuated vaccine. *Front Cell Infect Microbiol* 13: 1162299.
67. Chen Y, Cai S, Jian J (2019) Protection against *Vibrio alginolyticus* in pearl gentian grouper ( $\text{♀}Epinephelus fuscoguttatus \times \text{♂}Epinephelus lanceolatu$ ) immunized with an acfA-deletion live attenuated vaccine. *Fish Shellfish Immunol* 86: 875–881.
68. Zhou S, Tu X, Pang H, và c.s. (2020) A T3SS Regulator Mutant of *Vibrio alginolyticus* Affects Antibiotic Susceptibilities and Provides Significant Protection to *Danio rerio* as a Live Attenuated Vaccine. *Front Cell Infect Microbiol* 10.
69. Aly SM, Eissa AE, ElBanna NI, và c.s. (2021) Efficiency of monovalent and polyvalent *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* vaccines on the immune response and protection in gilthead sea bream, *Sparus aurata* (L.) against vibriosis. *Fish Shellfish Immunol* 111: 145–151.
70. Abotaleb MM, Soliman HM, Tawfik RG, và c.s. (2023) Efficacy of combined inactivated vaccines against *Vibrio alginolyticus* and *Streptococcus agalactiae* infections in Nile tilapia in Egypt. *Aquac Int* 1–18.
71. Peng YM, Tao JJ, Kuang SF, và c.s. (2021) Identification of Polyvalent Vaccine Candidates From Extracellular Secretory Proteins in *Vibrio alginolyticus*. *Front Immunol* 12: 736360.
72. Thi N, Thuy T, Nguyen DH, và c.s. (2013) Specific humoral immune response and protection against *Vibrio parahaemolyticus* in orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*. *Int J Aquat Sci* 4: 24–35.
73. Thi Bich Huyen V, Xuan Viet N, Thi Tam P, và c.s. (2020) Development of attenuated *Vibrio parahaemolyticus* mutant strains as potential live vaccines. *AsPac J Mol Biol Biotechnol* 28: 52–67.

74. Alipour M, Issazadeh K, Soleimani J (2012) Isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* from seawater and sediment samples in the southern coast of the Caspian Sea. *Comp Clin Path* 23: 129–133.
75. BAM Chapter 9: Vibrio | FDA Available at: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-9-vibrio>.
76. Frank JA, Reich CI, Sharma S, và c.s. (2008) Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 74: 2461–2470.
77. Hucker GJ, Conn HJ Further Studies On The Methods of Gram Staining.
78. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria (2006).
79. Gao Y, Wu H, Wang Q, và c.s. (2014) A live attenuated combination vaccine evokes effective immune-mediated protection against *Edwardsiella tarda* and *Vibrio anguillarum*. *Vaccine* 32: 5937–5944.
80. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, và c.s. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697–703.
81. Reed LJ, Muench H (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol* 27: 493–497.
82. Fish biologics: serodiagnostics and vaccines. (1981) *Dev Biol Stand* 49: 1–486.
83. Thị V, Huyền B, Việt NX, và c.s. (2019) Đặc điểm sinh hóa và di truyền của chủng *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan thận cho cá mú nuôi tại Cát Bà, Hải Phòng. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y* 62–62.
84. Liu PC, Lin JY, Hsiao PT, và c.s. (2004) Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased cobia *Rachycentron canadum*. *J Basic Microbiol* 44: 23–28.
85. Abdallah F Ben, Chaieb K, Kallel H, và c.s. (2009) RT-PCR assays for in vivo expression of *Vibrio alginolyticus* virulence genes in cultured gilthead *dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata*. *Ann Microbiol* 59: 63–67.
86. Khouadja S, Lamari F, Bakhrouf A (2013) Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during disease outbreaks. *Int Aquat Res* 2013 51 5: 1–11.
87. Marudhupandi T, Kumar TTA, Prakash S, và c.s. (2017) *Vibrio parahaemolyticus* a causative bacterium for tail rot disease in ornamental fish, *Amphiprion sebae*. *Aquac Reports* 8: 39–44.
88. Cai SH, Yao SY, Lu YS, và c.s. (2010) Immune response in *Lutjanus erythropterus* induced by the major outer membrane protein (OmpU) of *Vibrio alginolyticus*. *Dis Aquat Organ* 90: 63–68.
89. Mao Z, Yu L, You Z, và c.s. (2007) Expression and immunogenicity analysis of two iron-regulated outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 39: 763–769.

90. Nehlah R, Firdaus-Nawi M, Nik-Haiha NY, và c.s. (2017) Recombinant vaccine protects juvenile hybrid grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus lanceolatus*, against infection by *Vibrio alginolyticus*. *Aquac Int* 25: 2047–2059.

## PHỤ LỤC

## Phụ lục 1. Kết quả giải trình tự gene 16S rRNA của 8 chủng

STT	Tên chủng	Trình tự
1	A2 ( <i>V.alginolyticus</i> )	TGGTAGCGTCCCCCGAAGGTTAAACTACCTAC TTCTTTTGCAGCCCACTCCCATGGTGTGACGGG CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG TGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCG ACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCG GACTACGACGCACTTTTGGGATTCGCTCACTTT CGCAAGTTGGCCGCCCTCTGTATGCGCCATTGT AGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATG ATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGGTTT ATCACCGGCAGTCTCCCTGGAGTTCCCGACATT ACTCGCTGGCAAACAAGGATAAGGGTTGCGCTC GTTGCGGGACTTAACCCAACATTCACAACACG AGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGA GTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGT TCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCG CGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGC TTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTA ATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTT AACGCGTTAGCTCCGAAAGCCACGGCTCAAGG CCACAACCTCCAAGTAGACATCGTTTACGGCGT GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCC CACGCTTTCGCATCTGAGTGTCAGTATCTGTCC AGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTTCAG ATCTCTACGCATTCACCGCTACACCTGAAATT CTACCCCCCTCTACAGTACTCTAGTCTGCCAGTT TCAAATGCTATTCCGAGGTTGAGCCCCGGGCTT TCACATCTGACTTAACAAACCACCTGCATGCGC TTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCAC CCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTT AGCCGGTGCTTCTTCTGTCGCTAACGTCAAATA ATGCCGCTATTA ACTACACTACCTTCCTCACGA CTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTC ATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCC CATTGTGCAATATTC CCACTGCTGCCTCCCGTA

		<p>GGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGGGGCTG  ATCATCCCTCAGACAGCTAGGGATCGTCGCCTN  GGTGANCCCTTACCTNCCAAGTACTATTCCAC  CTAGGCTATTCTGACCGAAAGGCCANAGGCCCC  CTTGGGCCCAAGGCATTTGGGGTAAACTTTCAA  GGGTCCCCCAAGGGGAATTTNNGATTTTCC  CCCCCCCCCTTTCCCAAGGTAATAATTTT  CCCCTTTTGTGCGCCCCCTTTTAAAAAA  A</p>
2	<p>TB3  (<i>V. alginolyticus</i>)</p>	<p>CGTCCCCCGAAGGTAAACTACTTCTTTT  GCAGCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTG  TACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGGCATT  CTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCAT  GGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACG  ACGCACTTTTTGGGATTCGCTCACTTTCGCAAGT  TGGCTGCCCTCTGTATGCGCCATTGTAGCACGT  GTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTT  GACGTTCGTCACCTTCCCTCCGGTTTATCACCG  GCAGTCTCCCTGGAGTCCCGACATTACTCGCT  GGCAAACAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCG  GGACTTAACCAACATTTACAACACGAGCTGA  CGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCC  GAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTG  GATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGC  ATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGC  GGGCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAATCTTG  CGACCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAACGCG  TTAGCTCCGAAAGCCACGGCTCAAGGCCACAAC  CTCCAAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACTAC  CAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTT  CGCATCTGAGTGTGAGTATCTGTCCAGGGGGCC  GCCTTCGCCACCGGTATTCCTTCAGATCTCTACG  CATTCACCGCTACACCTGAAATTCTACCCCCCT  CTACAGTACTCTAGTCTGCCAGTTTCAAATGCA  ATTCCGAGGTTGAGCCCCGGGCTTTCACATCTG  ACTTAACAACCACCTGCATGCGCTTTACGCC  AGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCTCCGTAT  TACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGC  TTCTTCTGTCGCTAACGTCAAATAATGCAGCTA</p>



		<p>TTAACTACACTACCTTCCTCACGACTGAAAGTG  CTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCNACACGCGG  CATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAA  TATTCCCCTGCTGCCTCCGTAGGAATCTGGAC  CGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCTGATCTCCTCTC  AGACCACTAGGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCCT  TACCTCNCCACTAGCTAATCCACCTAGGNNANC  CTGACCCAAAGGCCCAAGGCCCCCTTTGGCCC  GAGGCTTTGGGGGTTATCTTTTTTCAGGGTTTCCC  CCCCTGGGGG</p>
3	<p>QN4  (<i>V. parahaemolyticus</i>)</p>	<p>TCGAGCGGAAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGG  AACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGA  GTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGA  TAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGA  TGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGC  CTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAG  CTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGA  CGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCC  ACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTAC  GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG  GCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTG  AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGT  CGTGAGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTGCATT  ATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCT  AACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG  GGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAA  AGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTG  AAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTG  AACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGG  TAGAATTTAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA  GATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCC  CCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAA  GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG  TAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGG  TTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAAC  GCGTTAAGTAGACGCCAGGGGTGTACGGTCGC  AAGATTA AAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC  CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA  TGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACAT</p>

		<p>CCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTT  CGGGA ACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTC  GTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTAAAGTC  CCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCC  AGCGAGTAATGTTCGGGA ACTCCAGGGAGACTG  CCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGAC  GTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTA  CACACGTGCTACAATGGCGCATA CAGAGGGCA  GCCAACTTGCGAAAGTGAGCGAATCCCAAAA  GTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTC  GACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTG  GATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGC  CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTG  GGCTGCAAAAGAAGTAGGTAGTTAACCTCTAA  AAAAGTGCTAACCT</p>
4	<p>HP4  (<i>V. parahaemolyticus</i>)</p>	<p>TGCAGTCGAGCGGAAACGAGTTATCTGAACCTT  CGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACG  GGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTG  GGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACC  GCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCT  TCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGG  GATTAGCTAGTTGGTAGGTAAGGGCTCACCAAG  GCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATC  AGCCACACTGGA ACTGAGACACGGTCCAGACT  CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC  AATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGT  GTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTT  TCAGTCGTGAGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCT  GCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACC  GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAGG  AGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT  AAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATG  TAAAGCCC GGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTT  GAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGG  GTAGATTT CAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA  GATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCC  CCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAG  CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGT  AGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGT</p>

		<p>TGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACG  CGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCA  AGATTA AAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC  GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAT  GCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATC  CAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTC  GGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGC  TCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCC  CGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCCA  GCGAGTAATGTCTGGGAACTCCAGGGAGACTGC  CGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACG  TCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTAC  ACACGTACAATGGCGCATAACAGAGGGCAGCCA  ACTTGCGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGC  GTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACT  CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATC  AGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG  TACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCT  GCAAAGAAGTAGGTAGTTT</p>
5	<p>T4  (<i>V.parahaemolyticus</i>)</p>	<p>ACGTGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACG  GCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTA  GGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGG  AAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGG  CCAAAGAGGGGGACCTTCCGGCCTCTCGCGTCA  GGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGA  GGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCT  GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAC  GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC  AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCT  GATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCT  TCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAG  GTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGTT  AGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGC  CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCG  TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCA  GGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGG  GCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAG  ACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTCA  GGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAG</p>

		<p>GAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACA  GATACTGACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGA  GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC  CGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTT  GAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTA  GACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA  ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGC  GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCG  AAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAC  TTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTC  TGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG  TGTTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGA  GCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCCAGCGAGTAA  TGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATA  AACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCA  TCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGC  TACAATGGCGCATAACAGAGGGCAGCCA  ACTGCGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCGTCGT  AGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATG  AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAAT  GCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC  ACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAA  AAGAAGTAGGTAGTTTAACCTTCGGGGGGACG  CTT</p>
6	<p>ND22  (<i>V. parahaemolyticus</i>)</p>	<p>TGCAGTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTC  GGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGG  GTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGG  GGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATAACCG  CATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTT  CGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGG  ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAG  GCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATC  AGCCACACTGGA  ACTGAGACACGGTCCAGACT  CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC  AATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGT  GTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTT  TCAGTCGTGAGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCT  GCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACC  GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG</p>

		<p>GAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGC  GTAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGA  TGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTCGGAATTGCA  TTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGG  GGGTAGAATTTAGGTGTAGCGGTGAAATGCGT  AGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCG  GCCCCCTGGACAGAATACTGACACTCAGATGCG  AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC  TGGTAGTCCACGCCGTAAAGGATGTCTACTTGG  AGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCT  AACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGG  TCGCAAGATTA AAACTCAAATGAATTGACGGG  GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT  TCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTG  ACATCCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTG  CCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGC  TGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTA  AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTT  TGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAG  ACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGA  CGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGG  GCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAG  GGCAGCCA ACTTGCGAAAGTGAGCGAATCCCA  AAAAGTGCGTCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCA  ACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT  CGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCC  GGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGG  AGTGGGCTGCAAAGAAGTAGGTAGTTAACCT  TCGGGCC</p>
7	<p>N3  (<i>V. alginolyticus</i>)</p>	<p>GTGCATTGGCGGCAGCTACACATGCAGTCGAGC  GGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATA  ATTCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCT  AGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTG  GAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGG  GCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTC  AGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTG  AGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAG  CTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAC  TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG</p>

		<p> CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCC  TGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCC  TTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAA  GGTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGT  TAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTG  CCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGC  GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGC  AGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGG  GGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCA  GACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTC  AGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAA  GGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGAC  AGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGG  AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG  CCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCT  TGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGT  AGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAA  AACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAG  CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGC  GAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAA  CTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACT  CTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTC  GTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACG  AGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCCAGCGAGTA  ATGTCCGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGAT  AAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTC  ATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTG  CTACAATGGCGCATAACAGAGGGCGGCCAACTT  GCGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCGTGCG  TAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCAT  GAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGA  ATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGAC  ACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCA  AAAGAAGTAGGTAGTTTAACCTTCGGGGGGAC  GCTACCACTTTGTTCTGAAAA </p>
8	<p> QN36  (<i>V. alginolyticus</i>) </p>	<p> GCGGGGCGTCAGCTACACATGCAGTCGAGCGG  AACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAATGATAAC  GGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCT  AGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTG </p>

	<p>GAAACGATGGCTAATACCGCGTGATGCCTACGG GCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTC AGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTG AGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAG CTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCC TGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCC TTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAA GGTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGT TAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTG CCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGC GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGC AGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGG GGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCA GACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTC AGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAA GGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGAC AGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGG AGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACG CCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCT TGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGT AGACCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAA AACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAG CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGC GAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAA CTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACT CTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTC GTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACG AGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCCAGCGAGTA ATGTCCGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGAT AAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTC ATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTG CTACAATGGCGCATAACAGAGGGCGGCCAACTT GCGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCGTCG TAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCAT GAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGA ATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC ACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCA</p>
--	--

		AAAGAAGTAGGTAGTTTAACCTTCGGGGGGAC GCTACCACTTGTGTTACAA
--	--	---

**Phụ lục 2.** Trình tự gene kháng nguyên của các chủng vi khuẩn

> *V. parahaemolyticus* N9 - *OmpK*

ATGCGTAAATCACTTCTAGCTCTTAGCCTTCTAGCGGCTACATCAGCTCC  
AGTATTGGCTGCAGATTACTCTGACGGCGATATCCACAAAAACGATTAC  
AAGTGGATGCAATTTAACCTAATGGGTGCATTCAACGAGAAAGGTTATG  
CTGAATCTTCTCATGATTACCTAGAGATGGAATTCGGCGGTTCGCTCTGGT  
ATTTTCGATCTTTACGGTTACGTTGACGTATTCAACCTAGCTTCTGACCC  
AGGCAGCGACAAAGCTGGCGGCGAGAAAATCTTCATGAAATTCGCACC  
ACGTATGTCTCTAGACGCGCTAACTGGTAAAGACCTATCTTTCGGTCTCTG  
TTCAAGAGCTATACGTTTCTACTCTAATGGAGTGGGGCGGTAACCTCTGA  
CGTAACTCTCAAAAAATCGGTCTAGGTTCTGACGTGATGGTACCTTGGT  
TAGGCAAAATCGGCCTAAACCTATACGGTACTTACGATGGCAACAAGAA  
AGATTGGAACGGTTTCCAAGTTTCTACTAACTGGTTCAAACCATTCTTCT  
TCTTCGAGAACGGTTCATTCATTTCTTACCAAGGTTACATCGATTACCAA  
TTCGGTATGGATGACGACAAAGGTAACAAGTTCAACACTACAGCGTCTA  
ACGGCGGTGCAATGTTCAACGGTATCTACTGGCACTCTGACCGCTTTGC  
AGTTGGTTACGGTCTAAAACCTTACAAAGACGTGTACGGTTTCAAAGAC  
GGCGAAGCTCTACCATGGGGTCACAAACCAGAATCTTCTGGTGCTGGTC  
ACTACGTAGCAGTAACTTACAAGTTCTAA

> *V. parahaemolyticus* N9 – *OmpU*

ATGAAAAGACTCTAATTGCTCTTTCTGTATCTGCAGCAGCTATGGCAA  
CTGGCGTTAACGCAGCTGAACTTTACAACCAAGACGGCACTTCTCTAGA  
AATGGGCGGCCGCGCTGAAGCACGTCTATCTATGAAAGATGGCGACGCT  
CAAGACAACCTCTCGTATCCGTCTAACTTCCTTGGTACTCAAGCTATCAA  
CGACAACCTTTACGGTGTGGTTTCTGGGAAGGTGAGTTCACTACCAAC  
GAACAAGGTGGTGTGATGGTGACGTAAATAAAGACAGCAGCAACCTA  
GACTCTGTTACGCATACGCTGGTCTTGGCGGTGCATGGGGTGAGTTCA  
CTTACGGTAAAAACGAAGGTGCACTAGGCGTTATCACTGATTTACAGAA  
TATCATGGCTTACCACGGTAACTCAGCAGCTGACAAACTAGCAGTAGCT  
GACCGTTCAGACAACATGATGTCTTACAAAGGTCAATTTCGAAAACCTAA  
GCGTTAAAGCAAGCTACCGTTTCGCAGACCGCAAACCTAAACGATGCTGG  
TACTGAATACACTGACAACGGTCAAGACGGCTACTCTCTATCTGCAATC  
TACGCAGTAGCAGACACAGGTCTTGAGCTAGGTGCTGGTTACGCAGACC



AAGACGAAGCTAACGAATACATGCTAGCTGCATCTTACACTATGGGTGA  
 CCTATACTTCGCTGGTATCTTCACTGACGGTGAAAAAGCGAAAAGCTGAA  
 GGTGACTACACTGGTTACGAACTAGCTGGTGCTTACACTCTAGGTCAA  
 CAGTATTCACAACAACGTACAACAACGCAGAACTAACAAACGAACTT  
 CTGCTAACAACTTCGCTGTTGATGCATCTTACTACTTCAAGCCTAACTTC  
 CGTGGTTACGTTTCATACAACTTCAACCTAATCGACTCTGGCGATAAACT  
 AGGTAAAGTTGGTGGCAACACTACAGCTTCTAAAGCTGATGCAGAAGAC  
 GAGCTAGCTCTAGGTCTACGTTACGACTTCTAA

>*V. alginolyticus* A2 – *OmpK*

GGATCCATGCGTAAATCACTTTTAGCTCTTAGCCTTCTAGCGGCTACTTC  
 AGCTCCAGTTATGGCGGCAGATTACTCTGACGGCGATATTCACAAAAC  
 GATTACAAGTGGATGCAATTTAACCTAATGGGTGCATTTGACGAACTTC  
 CAGGTGAGTCTTCACACGACTACCTAGAAATGGAATTCGGCGGCCGCTC  
 TGGTATCTTCGACCTTTACGGCTACGTTGATGTATTCAACCTAACTTCTG  
 ATCCAGGTAGCGACAAAGCTGGCGCAGAGAAGATCTTTATGAAATTCGC  
 TCCACGTATGTCTCTAGATGCGGTAACCTGGTAAAGACCTATCTTTCCGGTC  
 CAGTTCAAGAGCTATACGTTGCAACTCTAATCGAGTGGGGTGGTAACTC  
 TGGTGTTAACTCTCAAAAAATCGGTCTAGGTTCTGACGTAATGGTTCCTT  
 GGTTTGGTAAAGTTGGTGTTAACCTATACGGCACTTACGACGGCAACAA  
 AAAGGATTGGAACGGTTTCCAAATCTCGACTAACTGGTTCAAACCATTC  
 TACTTCTTCGAGAACGGTTCATTCATTTCTTACCAAGGCTACATCGATTA  
 CCAATTCGGTATGGATGATGCTGCTGGTAACAAGTTTGGTTCAACCGCG  
 TCAAACGGTGGTGCAATGTTCAACGGTATCTACTGGCACTCAGACCGCT  
 TCGCAGTGGGTACGGTCTAAAAGGTTACAAAGACGTGTACGGTATCAA  
 AGATACTGATGGGTTCAAGTCAACTGGCTTTGGCCACTACCTTGCTGTA  
 ACTTACAAGTTCTAAAAGCTT

>*V. alginolyticus* A2 – *OmpU*

GGATCCATGAAAAAGACTCTAATTGCTCTTTCTGTATCTGCAGCAGCTAT  
 GGCAACTGGCGTAAACGCAGCTGAACTTTACAACCAAGACGGTACTTCT  
 CTAGAAATGGGCGGCCGTGCTGAAGCACGTCTATCTATGAAAGATGGCG  
 ACGCTCAAGACAAATCTCGCATCCGTCTAACTTCCTTGGTAAACAAGA  
 AATCAATGACAACCTATACGGTGTTGGTTTCTGGGAAGGTGAATTTGAG  
 ACTGCTCAAAACGGTACTGTAGACGGCGACGACAAGAGCGATCTAGAA  
 ACTCGTCTTGCTTACGCTGGTCTTGGCGGTGCTTACGGTGAGTTCGCATA  
 CGGTAAAAGTGAAGGTGCACTAGGCGTTATCACTGACTTCACAGATATC

ATGGCTTACCACGGTAACTCTGCAGCAGACAAACTAGCTGTATCAGACC  
GTACAGACAACATGATGGCTTACAAAGGCCAGTTTGAAAACCTAAGCGT  
AAAAGCAAGCTACCGCTTCGCTGATCGTATGGAAAACAAAAACACTGGT  
GAGTACTACGACAACAACAAGACGGTACTCTCTATCTGCAATCTACG  
CTCTAGCTGACACTGGTCTTGAGCTAGGTGCTGGTTACGCAGATCAAGA  
CAAAGCTAACGAGTACATGCTAGCTGCATCTTACACAATGTCTGATCTTT  
ACTTCGCTGGTGTATTCAGTACGGCGAGAAAATGGAAGATTCAAACAA  
CAGTAACACAGTTGATTACACTGGTTACGAGCTAGCGGGTGCTTACACT  
CTAGGCCAAACAGTATTTACAACATCATAACAATGCAGAAACTAACA  
ACGAAACTTCTGCAAACAACCTTCGCTGTTGATGCTTCTTACTACTTCAAG  
CCTAACTTCCGTGGTTACATTTCTTACAACCTCAACCTGATTGATGCAGG  
TGACAAGTTTGGTTCAACTGACACTAGCAAAACAGTTGCAACTAAGATC  
GATGCTGAAGACGAGCTAGCTCTAGGTCTACGTTACGACTTCTAAAAGC  
TT

**Phụ lục 3.** Kết quả so sánh trình tự gene *OmpK* và *OmpU* của chủng *V. alginolyticus* A2 và *V. parahaemolyticus* trên công cụ BLAST

**Vibrio alginolyticus strain TrGY020402 outer membrane protein K (ompK) gene, complete cds**Sequence ID: [GU318325.1](#) Length: 798 Number of Matches: 1Range 1: 3 to 790 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1445 bits(782)	0.0	786/788(99%)	0/788(0%)	Plus/Plus
Query 4	GCGTAAATCACTTTTAGCTCTTAGCCTTCTAGCGGCTACTTCAGCTCCAGTTATGGCGGC	63		
Sbjct 3	GCGTAAATCACTTTTAGCTCTTAGCCTTCTAGCGGCTACTTCAGCTCCAGTTATGGCGGC	62		
Query 64	AGATTACTCTGACGGCGATATTCACAAAAACGATTACAAGTGGATGCAATTTAACCTAAT	123		
Sbjct 63	AGATTACTCTGACGGCGATATTCACAAAAACGATTACAAGTGGATGCAATTTAACCTAAT	122		
Query 124	GGGTGCATTTGACGAACTTCCAGGTGAGTCTTCACACGACTACCTAGAAATGGAATTCGG	183		
Sbjct 123	GGGTGCATTTGACGAGCTTCCAGGTGAGTCTTCACACGACTACCTAGAAATGGAATTCGG	182		
Query 184	CGGCCGCTCTGGTATCTTCGACCTTACGGCTACGTTGATGTATTCAACCTAACTTCTGA	243		
Sbjct 183	CGGCCGCTCTGGTATCTTCGACCTTACGGCTACGTTGATGTATTCAACCTAACTTCTGA	242		
Query 244	TCCAGGTAGCGACAAAGCTGGCGCAGAGAAGATCTTTATGAAATTCGCTCCACGTATGTC	303		
Sbjct 243	TCCAGGTAGCGACAAAGCTGGCGCAGAGAAGATCTTTATGAAATTCGCTCCACGTATGTC	302		
Query 304	TCTAGATGCGGTAACGGTAAAGACCTATCTTTCGGTCCAGTTCAGAGCTATACGTTGC	363		
Sbjct 303	TCTAGATGCGGTAACGGTAAAGACCTATCTTTCGGTCCAGTTCAGAGCTATACGTTGC	362		
Query 364	AACTCTAATCGAGTGGGGTGGTAACTCTGGTGTAACTCTCAAAAAATCGGTCTAGGTTTC	423		
Sbjct 363	AACTCTAATCGAGTGGGGTGGTAACTCTGGTGTAACTCTCAAAAAATCGGTCTAGGTTTC	422		
Query 424	TGACGTAATGGTTCCTTGGTTTGGTAAAGTTGGTGTAACTATAACGGCACTTACGACGG	483		
Sbjct 423	TGACGTAATGGTTCCTTGGTTTGGTAAAGTTGGTGTAACTATAACGGCACTTACGACGG	482		
Query 484	CAACAAAAGGATTGGAACGGTTTCCAAATCTCGACTAACTGGTTCAAACCATTTACTT	543		
Sbjct 483	CAACAAAAGGATTGGAACGGTTTCCAAATCTCGACTAACTGGTTCAAACCATTTACTT	542		
Query 544	CTTCGAGAACGGTTCATTCAATTTCTACCAAGGCTACATCGATTACCAATTCGGTATGGA	603		
Sbjct 543	CTTCGAGAACGGTTCATTCAATTTCTACCAAGGCTACATCGATTACCAATTCGGTATGGA	602		
Query 604	TGATGCTGCTGGTAACAAGTTTGGTTCAACCGCGTCAAACGGTGGTGAATGTTCAACGG	663		
Sbjct 603	TGATGATGCTGGTAACAAGTTTGGTTCAACCGCGTCAAACGGTGGTGAATGTTCAACGG	662		
Query 664	TATCTACTGGCACTCAGACCGCTTCGACGTGGGTTACGGTCTAAAAGGTTACAAAGACGT	723		
Sbjct 663	TATCTACTGGCACTCAGACCGCTTCGACGTGGGTTACGGTCTAAAAGGTTACAAAGACGT	722		
Query 724	GTACGGTATCAAAGATACTGATGGGTTCAAGTCAACTGGCTTTGGCCACTACCTTGCTGT	783		
Sbjct 723	GTACGGTATCAAAGATACTGATGGGTTCAAGTCAACTGGCTTTGGCCACTACCTTGCTGT	782		
Query 784	AACTTACA 791			
Sbjct 783	AACTTACA 790			

**Vibrio alginolyticus OmpU gene, complete cds**Sequence ID: [FJ176404.1](#) Length: 1023 Number of Matches: 1Range 1: 4 to 1016 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1866 bits(1010)	0.0	1012/1013(99%)	0/1013(0%)	Plus/Plus
Query 3	AAAAAGACTCTAATTGCTCTTTCTGTATCTGCAGCAGCTATGGCAACTGGCGTAAACGCA			62
Sbjct 4	AAAAAGACTCTAATTGCTCTTTCTGTATCTGCAGCAGCTATGGCAACTGGCGTAAACGCA			63
Query 63	GCTGAACCTTTACAACCAAGACGGTACTTCTCTAGAAATGGGCGGCCGTGCTGAAGCACGT			122
Sbjct 64	GCTGAACCTTTACAACCAAGACGGTACTTCTCTAGAAATGGGCGGCCGTGCTGAAGCACGT			123
Query 123	CTATCTATGAAAGATGGCGACGCTCAAGACAAATCTCGCATCCGCTCAAACCTCCTTGGT			182
Sbjct 124	CTATCTATGAAAGATGGCGACGCTCAAGACAAATCTCGCATCCGCTCAAACCTCCTTGGT			183
Query 183	AAACAAGAAATCAATGACAACCTATACGGTGTGGTTTCTGGGAAGGTGAATTTGAGACT			242
Sbjct 184	AAACAAGAAATCAATGACAACCTATACGGTGTGGTTTCTGGGAAGGTGAATTTGAGACT			243
Query 243	GCTCAAAACGGTACTGTAGACGGCGACGACAAGAGCGATCTAGAAACTCGTCTTGCTTAC			302
Sbjct 244	GCTCAAAACGGTACTGTAGACGGCGACGACAAGAGCGATCTAGAAACTCGTCTTGCTTAC			303
Query 303	GCTGGTCTTGGCGGTGCTTACGGTGAGTTCGCATACGGTAAAACCTGAAGGTGCACTAGGC			362
Sbjct 304	GCTGGTCTTGGCGGTGCTTACGGTGAGTTCGCATACGGTAAAACCTGAAGGTGCACTAGGC			363
Query 363	GTTATCACTGACTTCACAGATATCATGGCTTACCACGGTAACTCTGCAGCAGACAAACTA			422
Sbjct 364	GTTATCACTGACTTCACAGATATCATGGCTTACCACGGTAACTCTGCAGCAGACAAACTA			423
Query 423	GCTGTATCAGACCGTACAGACAACATGATGGCTTACAAAGGCCAGTTTGAAAACCTAAGC			482
Sbjct 424	GCTGTATCAGACCGTACAGACAACATGATGGCTTACAAAGGCCAGTTTGAAAACCTAAGC			483
Query 483	GTAAAAGCAAGCTACCGCTTCGCTGATCGTATGGAAAACAAAAACACTGGTGAGTACTAC			542
Sbjct 484	GTAAAAGCAAGCTACCGCTTCGCTGATCGTATGGAAAACAAAAACACTGGTGAGTACTAC			543
Query 543	GACAACAAACAAGACGGTTACTCTCTATCTGCAATCTACGCTCTAGCTGACACTGGTCTT			602
Sbjct 544	GACAACAAACAAGACGGTTACTCTCTATCTGCAATCTACGCTCTAGCTGACACTGGTCTT			603
Query 603	GAGCTAGGTGCTGGTTACGCAGATCAAGACAAAGCTAACGAGTACATGCTAGCTGCATCT			662
Sbjct 604	GAGCTAGGTGCTGGTTACGCAGATCAAGACAAAGCTAACGAGTACATGCTAGCTGCATCT			663
Query 663	TACACAATGTCTGATCTTTACTTCGCTGGTGTATTCACTGACGGCGAGAAAATGGAAGAT			722
Sbjct 664	TACACAATGTCTGATCTTTACTTCGCTGGTGTATTCACTGACGGCGAGAAAATGGAAGAT			723
Query 723	TCAAACAACAGTAACACAGTTGATTACACTGGTTACGAGCTAGCGGGTGCTTACACTCTA			782
Sbjct 724	TCAAACAACAGTAACACAGTTGATTACACTGGTTACGAGCTAGCGGGTGCTTACACTCTA			783
Query 783	GGCCAAACAGTATTTACAACATCATAACAACATGCAGAAACTAACAACGAAACTTCTGCA			842
Sbjct 784	GGCCAAACAGTATTTACAACATCATAACAACATGCAGAAACTAACAACGAAACTTCTGCA			843
Query 843	AACAACCTTCGCTGTTGATGCTTCTTACTACTTCAAGCCTAACTTCCGTGGTTACATTTCT			902
Sbjct 844	AACAACCTTCGCTGTTGATGCTTCTTACTACTTCAAGCCTAACTTCCGTGGTTACATTTCT			903
Query 903	TACAACCTCAACCTGATTGATGCAGGTGACAAGTTTGGTTCAACTGACACTAGCAAAAACA			962
Sbjct 904	TACAACCTCAACCTGATTGATGCAGGTGACAAGTTTGGTTCAACTGACACTAGCAAAAACA			963
Query 963	GTTGCAACTAAGATCGATGCTGAAGACGAGCTAGCTCTAGGTCTACGTTACGA 1015			
Sbjct 964	GTTGCAACTAAGATCGATGCTGAAGACGAGCTAGCTCTAGGTCTACGTTACGA 1016			

**Vibrio parahaemolyticus strain 4L outer membrane protein U gene, complete cds**Sequence ID: [JN566046.1](#) Length: 1017 Number of Matches: 1Range 1: 1 to 1008 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1818 bits(984)	0.0	1000/1008(99%)	0/1008(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGAAAAAGACTCTAATTGCTCTTTCTGTATCTGCAGCAGCTATGGCAACTGGCGTTAAC			60
Sbjct 1	ATGAACAAGACTCTGATTGCTCTTTCTGTATCTGCAGCAGCTATGGCAACTGGCGTTAAC			60
Query 61	GCAGCTGAACCTTACAACCAAGACGGCACTTCTCTAGAAATGGGCGGCCGCGCTGAAGCA			120
Sbjct 61	GCAGCTGAACCTTACAACCAAGACGGCACTTCTCTAGAAATGGGCGGCCGCGCTGAAGCA			120
Query 121	CGTCTATCTATGAAAGATGGCGACGCTCAAGACAACCTCTCGTATCCGTCTAAACTTCCTT			180
Sbjct 121	CGTCTATCTATGAAAGATGGCGATGCTCAAGACAACCTCTCGTATCCGTCTAAACTTCCTT			180
Query 181	GGTACTCAAGCTATCAACGACAACCTTTACGGTGTGGTTTCTGGGAAGGTGAGTTCACT			240
Sbjct 181	GGTACTCAAGCTATCAACGACAACCTTTACGGTGTGGTTTCTGGGAAGGTGAGTTCACT			240
Query 241	ACCAACGAACAAGGTGGTGTGATGGTGACGTAATAAAGACAGCAGCAACCTAGACACT			300
Sbjct 241	ACCAACGAACAAGGTGGTGTGATGGGGACGTAATAAAGACAGCAGCAACCTAGACACT			300
Query 301	CGTTACGCATACGCTGGTCTTGGCGGTGCATGGGGTGAGTTCACTTACGGTAAAAACGAA			360
Sbjct 301	CGTTACGCATACGCTGGTCTTGGCGGTGCATGGGGTGAGTTCACTTACGGTAAAAACGAA			360
Query 361	GGTGCCTAGGCGTTATCACTGATTTACAGATATCATGGCTTACCACGGTAACTCAGCA			420
Sbjct 361	GGTGCCTAGGCGTTATCACTGATTTACAGATATCATGGCTTACCACGGTAACTCAGCA			420
Query 421	GCTGACAAACTAGCAGTAGCTGACCGTTACAGACAACATGATGTCTTACAAAGGTCAATTC			480
Sbjct 421	GCTGACAAACTAGCAGTAGCTGACCGTTACAGACAACATGATGTCTTACAAAGGTCAATTC			480
Query 481	GAAAACTAAGCGTTAAAGCAAGCTACCGTTTCGCAGACCGCAAACTAAACGATGCTGGT			540
Sbjct 481	GAAAACTAAGCGTTAAAGCAAGCTACCGTTTCGCAGACCGCAAACTAAACGATGCTGGT			540
Query 541	ACTGAATACACTGACAACGGTCAAGACGGCTACTCTCTATCTGCAATCTACGCAGTAGCA			600
Sbjct 541	ACTGAATACACTGACAACGGTCAAGACGGCTACTCTCTATCTGCAATCTACGCAGTAGCA			600
Query 601	GACACAGGTCTTGAGCTAGGTGCTGGTTACGCAGACCAAGACGAAGCTAACGAATACATG			660
Sbjct 601	GACACAGGTCTTGAGCTAGGTGCTGGTTACGCAGACCAAGACGAAGCTAACGAATACATG			660
Query 661	CTAGCTGCATCTTACACTATGGGTGACCTATACTTCGCTGGTATCTTCACTGACGGTGAA			720
Sbjct 661	TTAGCTGCATCTTACACTATGGGTGACCTATACTTCGCTGGTATCTTCACTGACGGTGAA			720
Query 721	AAAGCGAAAACTGAAGGTGACTACACTGGTTACGAACTAGCTGGTGCTTACACTCTAGGT			780
Sbjct 721	AAAGCGAAAACTGAAGGTGACTACACTGGTTACGAACTAGCTGGTGCTTACACTCTAGGT			780
Query 781	CAAACAGTATTCACAACAACGTACAACAACGCAGAACTAACAAACGAAACTTCTGCTAAC			840
Sbjct 781	CAAACAGTATTCACAACAACGTACAACAACGCAGAACTAACAAACGAAACTTCTGCTAAC			840
Query 841	AACTTCGCTGTTGATGCATCTTACTACTTCAAGCCTAACTCCGTGGTTACGTTTCATAC			900
Sbjct 841	AACTTCGCTGTTGATGCATCTTACTACTTCAAGCCTAACTCCGTGGTTACGTTTCATAC			900
Query 901	AACTTCAACCTAATCGACTCTGGCGATAAAGTAAAGTTGGTGGCAACTACAGCT			960
Sbjct 901	AACTTCAACCTAATCGACTCTGGCGATAAAGTAAAGTTGGTGGCAACTACAGCA			960
Query 961	TCTAAAGCTGATGCAGAAGACGAGCTAGCTCTAGGTCTACGTTACGAC			1008
Sbjct 961	TCTAAAGCTGATGCAGAAGACGAGCTAGCTCTAGGTCTACGTTACGAC			1008

**Vibrio parahaemolyticus strain OS4 outer membrane protein K (ompK) gene, complete cds**Sequence ID: [HQ157203.1](#) Length: 819 Number of Matches: 1Range 1: 1 to 819 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1496 bits(810)	0.0	816/819(99%)	0/819(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGCGTAAATCACTTCTAGCTCTTAGCCTTCTAGCGGCTACATCAGCTCCAGTATTGGCT			60
Sbjct 1	ATGCGTAAATCACTTTTAGCTCTTAGCCTTCTAGCGGCTACATCAGCTCCAGTATTGGCT			60
Query 61	GCAGATTACTCTGACGGCGATATCCACAAAAACGATTACAAGTGGATGCAATTTAACCTA			120
Sbjct 61	GCAGATTACTCTGACGGCGATATCCACAAAAACGATTACAAGTGGATGCAATTTAACCTA			120
Query 121	ATGGGTGCATTCAACGAGAAAGGTTATGCTGAATCTTCTCATGATTACCTAGAGATGGAA			180
Sbjct 121	ATGGGTGCATTCAACGAGAAAGGTTATGCTGAATCTTCTCATGATTACCTAGAGATGGAA			180
Query 181	TTCGGCGGTCGCTCTGGTATTTTCGATCTTACGGTTACGTTGACGTATTCAACCTAGCT			240
Sbjct 181	TTCGGCGGTCGCTCTGGTATTTTCGATCTTACGGTTACGTTGACGTATTCAACCTAGCT			240
Query 241	TCTGACCCAGGCAGCGACAAAGCTGGCGGCGAGAAAATCTTCATGAAATTCGCACCACGT			300
Sbjct 241	TCTGACCCAGGCAGCGACAAAGCTGGCGGCGAGAAAATCTTCATGAAATTCGCACCACGT			300
Query 301	ATGTCTCTAGACGCGCTAACTGGTAAAGACCTATCTTTCGGTCTGTTCAGAGCTATAC			360
Sbjct 301	ATGTCTCTAGACGCGCTAACTGGTAAAGACCTATCTTTCGGTCTGTTCAGAGCTATAC			360
Query 361	GTTTCTACTCTAATGGAGTGGGGCGGTAAGTCTGACGTTAACTCTCAAAAAATCGGTCTA			420
Sbjct 361	GTTTCTACTCTAATGGAGTGGGGCGGTAAGTCTGACGTTAACTCTCAAAAAATCGGTCTA			420
Query 421	GGTTCTGACGTGATGGTACCTTGGTTAGGCAAAAATCGGCCTAAACCTATACGGTACTTAC			480
Sbjct 421	GGTTCTGACGTGATGGTACCTTGGTTAGGCAAAAATCGGCCTAAACCTATACGGTACTTAC			480
Query 481	GATGGCAACAAGAAAGATTGGAACGGTTTCCAAGTTTCTACTAACTGGTTCAAACCATTC			540
Sbjct 481	GATGGCAACAAGAAAGATTGGAACGGTTTCCAAGTTTCTACTAACTGGTTCAAACCATTC			540
Query 541	TTCTTCTTCGAGAACGGTTCATTCAATTTCTTACCAAGGTTACATCGATTACCAATTCGGT			600
Sbjct 541	TTCTTCTTCGAGAACGGTTCATTCAATTTCTTACCAAGGTTACATCGATTACCAATTCGGT			600
Query 601	ATGGATGACGACAAAGGTAACAAGTTCAACACTACAGCGTCTAACGGCGGTGCAATGTTC			660
Sbjct 601	ATGGATGACGACAAAGGTAACAAGTTCAACACTACAGCGTCTAACGGCGGTGCAATGTTC			660
Query 661	AACGGTATCTACTGGCACTCTGACCGCTTTCAGTTGGTTACGGTCTAAAACCTTACAAA			720
Sbjct 661	AACGGTATCTACTGGCACTCTGACCGCTTTCAGTTGGTTACGGTCTAAAACCTTACAAA			720
Query 721	GACGTGTACGGTTTCAAAGACGGCGAAGCTCTACCATGGGGTCACAAACCAGAATCTTCT			780
Sbjct 721	GACGTGTACGGTTTCAAAGACGGCGAAGCTCTACCATGGGGTCACAAACCAGAATCTTCT			780
Query 781	GGTGCTGGTCACTACGTAGCAGTAACTTACAAGTTCTAA 819			
Sbjct 781	GGTGCTGGTCACTACGTAGCAGTAACTTACAAGTTCTAA 819			