

# Tạo dòng, biểu hiện kháng nguyên F18 dung hợp peptide định hướng tế bào M trên bề mặt nấm men *Saccharomyces cerevisiae*

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



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

## TÓM TẮT

Bệnh tiêu chảy ở heo con sau cai sữa (post- weaning diarrhea, PWD) là một trong những vấn đề nghiêm trọng, gây thiệt hại nặng nề cho ngành chăn nuôi heo. Tác nhân gây bệnh chủ yếu là chủng vi khuẩn enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Độc tính của ETEC dựa trên hai thành phần là tiêm mao bám dính lên tế bào và độc tố gây mất nước. Nhiều công bố đã cho thấy F4 và F18 là hai nhân tố bám dính thường gặp nhất. Phương pháp phòng ngừa hiệu quả nhất đối với tác nhân vi khuẩn là vaccine. Vaccine uống là loại vaccine dễ sử dụng và có khả năng kích thích được miễn dịch niêm mạc. Hiện nay, vaccine phòng ngừa ETEC/F4 đã được thương mại hóa, tuy nhiên vaccine cho ETEC/F18 còn gặp nhiều khó khăn trong việc bảo vệ heo con. Để giải quyết vấn đề này, kháng nguyên F18 được dung hợp với peptide PEP, peptide định hướng tế bào M và biểu hiện trên bề mặt tế bào nấm men. Plasmid tái tổ hợp pGM1F1-pep-f18 được cấu trúc bằng cách chèn gene pep-f18 vào plasmid pGM1F1. Sau khi được tạo thành công, plasmid tái tổ hợp này được điện biến nạp và protein được biểu hiện trên bề mặt tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* MT8-1 khuyết dưỡng tryptophan. Kết quả kiểm tra biểu hiện cho thấy protein tái tổ hợp PEP-F18 đã biểu hiện thành công trên bề mặt nấm men *S. cerevisiae*. Như vậy đã tạo thành công chủng nấm men biểu hiện protein PEP-F18 trên bề mặt. Đây là nguồn nguyên liệu sử dụng cho các thử nghiệm phát triển hệ thống vaccine uống.

**Từ khoá:** Enterotoxigenic *Escherichia coli* F18 (ETEC/F18), *Saccharomyces cerevisiae*, tế bào M, vaccine uống

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

## Liên hệ

**Trần Văn Hiếu**, Khoa Sinh học-Công nghệ  
Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên,  
ĐHQG-HCM

Email: tvhieu@hcmus.edu.vn

## Lịch sử

- Ngày nhận: 30-06-2025
- Ngày sửa đổi: 31-12-2025
- Ngày chấp nhận: 10-02-2026
- Ngày đăng: 17-06-2026

## DOI:

<https://doi.org/10.32508/vnuhcmjarns.v10i2.1461>



Check for updates

## Bản quyền

© Tập chí ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

## GIỚI THIỆU

Chăn nuôi heo là ngành công nghiệp lâu đời và giữ vai trò quan trọng, đảm bảo nguồn thực phẩm cho nhu cầu trong/ngoài nước, cũng như đóng góp vào sự phát triển chung của nền kinh tế. Tuy nhiên, từ khi xuất hiện, ngành này luôn gặp phải nhiều khó khăn, trong đó dịch bệnh là vấn đề lớn nhất. Trong đó, tiêu chảy ở heo con sau cai sữa (post- weaning diarrhea, PWD) là bệnh thường gặp với tỷ lệ chết cao. Bệnh xảy ra trong giai đoạn đầu sau cai sữa với các triệu chứng bệnh như heo con tiêu chảy nặng, giảm trọng lượng cơ thể, rối loạn nhịp tim, và chết do suy tim<sup>1</sup>. Tỷ lệ heo mắc bệnh có thể lên đến 50% và gây chết tới 30% trong hai tháng đầu sau khi bùng phát dịch bệnh<sup>2</sup>. Dịch bệnh có thể xảy ra khi nhiều yếu tố cùng tác động tới heo con như: thay đổi chế độ ăn từ ăn theo mẹ sang ăn độc lập; môi trường sống thay đổi; thay đổi cấu trúc mô ở ruột non và tác nhân vi sinh vật. Trong đó, nguyên nhân gây bệnh chủ yếu là do vi sinh vật, và Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) là loại vi khuẩn thường gặp nhất<sup>3</sup>. Hai loại độc tố chính được tạo ra bởi ETEC là độc tố không bền nhiệt có phân tử lượng lớn (Heat-labile Toxin, LT) và độc tố bền nhiệt

phân tử lượng nhỏ (Heat-labile Toxin, ST). Các độc tố này tác động lên biểu mô ruột của heo, tăng tiết và hạn chế việc hấp thụ nước, chất điện giải gây tiêu chảy từ nhẹ đến nặng và có thể dẫn đến tử vong<sup>4</sup>. Để xâm nhập và gây bệnh, việc đầu tiên ETEC cần thực hiện là bám lên tế bào biểu mô ruột. Điều này được thực hiện thông qua tương tác giữa tiêm mao và các thụ thể của chúng trên bề mặt tế bào<sup>5</sup>. Hai chủng ETEC gây PWD thường được tìm thấy nhất là các chủng chứa tiêm mao F4 (45,1%) và F18 (33,9%)<sup>6</sup>.

Biện pháp điều trị PWD hiệu quả nhất hiện nay là sử dụng kháng sinh như: enrofloxacin, spectinomycin, colistin. Nhưng sử dụng kháng sinh vẫn tồn tại nhiều hạn chế: điều trị trong thời gian dài, hiệu quả kém khi không được chữa trị kịp thời, tác động tiêu cực đến hệ vi sinh đường ruột, và là tác nhân dẫn đến hiện tượng kháng thuốc ở vi khuẩn. Một nghiên cứu ở Đại học Thái Bình cho thấy 34/36 trang trại nuôi heo ở Thái Bình có sự xuất hiện của gene *mcr-1*, đây là gene kháng kháng sinh Colistin, kháng sinh nhóm polymyxin, liệu pháp cuối cùng để điều trị vi khuẩn Gram âm đa kháng ở người<sup>7</sup>. Do đó, việc sử dụng kháng sinh quá mức có thể dẫn đến nhiều khó khăn

**Trích dẫn bài báo này:** Trân L V N, Gia M Q, Hiếu T V. Tạo dòng, biểu hiện kháng nguyên F18 dung hợp peptide định hướng tế bào M trên bề mặt nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. VNUHCM J. Adv. Res. Nat. Sci. 2026; 10(2):3620-3626.

cho việc điều trị PWD trên heo, và xa hơn là điều trị các bệnh nhiễm khuẩn trên người. Vì vậy, ngoài việc xây dựng, tối ưu phương pháp điều trị, các biện pháp phòng bệnh hiệu quả, kinh tế như vaccine cũng cần được tập trung nghiên cứu. Vaccine là sản phẩm sinh học chứa kháng nguyên, có khả năng kích thích tạo miễn dịch đặc hiệu chủ động, giúp phòng ngừa dịch bệnh. Nhiều nghiên cứu phát triển vaccine phòng chống PWD<sup>8,9</sup>, tuy nhiên các vaccine đã được thương mại hóa chỉ tạo đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với chủng ETEC/F4, mà không tạo được hiệu quả bảo vệ trước chủng ETEC/F18<sup>9-11</sup>. Điều này đến từ sự khác biệt về cấu trúc của hai tiêm mao. Trong khi tiểu phần bám dính của F18 là FedF, khác tiểu phần chính FedA, thì ở F4 tiểu phần bám dính và tiểu phần chính đều là FaeG. Bên cạnh đó, FedF có tính sinh miễn dịch yếu, cũng như liên kết FedF-FedA không bền vững trong cấu trúc tiêm mao tinh sạch. So với tiêm mao F4, rất khó để tạo được một vaccine hiệu quả kích hoạt đáp ứng miễn dịch với tiêm mao F18<sup>10</sup>. Do đó, phát triển vaccine phòng chống ETEC/F18 là vấn đề đang được quan tâm.

PWD là bệnh lây nhiễm qua đường ruột và phương pháp tốt nhất để phòng bệnh là kích thích đáp ứng miễn dịch đường uống. Vaccine uống có các ưu điểm như: không yêu cầu kỹ thuật cao, dễ sử dụng khi có thể trộn vào thức ăn hoặc hòa vào nước uống, và quan trọng nhất là vaccine uống tạo đáp ứng miễn dịch niêm mạc mạnh, giúp nhanh chóng trung hòa, và loại bỏ tác nhân gây hại khi chúng vừa xâm nhập<sup>12</sup>. Bên cạnh các ưu điểm trên, vaccine uống vẫn tồn tại một vài khó khăn nhất định. Đầu tiên là môi trường khắc nghiệt của đường tiêu hóa như pH thấp ở dạ dày, các enzyme tiêu hóa và muối mật có thể phân giải kháng nguyên vaccine. Tiếp theo, diện tích bề mặt ruột rộng lớn làm phân tán kháng nguyên. Và sau cùng là xu hướng dung nạp miễn dịch của đường ruột<sup>13</sup>. Do đó cần có các biện pháp để vận chuyển, bảo vệ kháng nguyên cũng như đưa kháng nguyên tới các tế bào miễn dịch ở ruột thông qua tế bào M. Tế bào M là một loại tế bào biểu mô ruột có cấu trúc đặc biệt: lông nhung ít hoặc bị tiêu giảm; lớp glycocalyx mỏng; mặt dưới có cấu trúc túi, nơi tập trung các tế bào trình diện kháng nguyên chuyên nghiệp (tế bào B, tế bào tua, v.v.). Tế bào này giúp bảo toàn và vận chuyển kháng nguyên đến các tế bào trình diện kháng nguyên ở phía dưới. Tuy nhiên có rất ít tế bào M trong tổng số các tế bào biểu mô ruột của heo, gây khó khăn trong việc phát triển vaccine kích thích miễn dịch niêm mạc<sup>14</sup>. Do đó, định hướng kháng nguyên tới tế bào M thông qua tương tác phối tử-thụ thể là một chiến lược phát triển vaccine tiềm năng. Hiện nay, nhiều cặp phối tử-thụ thể tế bào M đã được nghiên cứu, chúng có thể có bản chất là lectin, lipopolysaccharide hoặc protein<sup>15</sup>.

Nhờ vào sự phát triển công nghệ protein tái tổ hợp, việc định hướng kháng nguyên đến tế bào M thông qua các phối tử có bản chất protein đã trở thành một hướng nghiên cứu giàu tiềm năng. Protein prion (Cellular Prion Protein, PrPC) là một protein màng tế bào thuộc họ neo glycosylphosphatidylinositol, có mặt trên bề mặt tế bào M. Heat shock protein 60 (Hsp60) có nguồn gốc từ *Brucella abortus* đã cho thấy khả năng tương tác với thụ thể PrPC<sup>16</sup>. Do đó protein này có thể được sử dụng như một tín hiệu dẫn đường cho kháng nguyên tới tế bào miễn dịch đường ruột thông qua cổng tế bào M. Tuy nhiên, kích thước lớn của Hsp60 (60 kDa) gây khó khăn cho việc dung hợp kháng nguyên cũng như có thể cản trở không gian khi tiếp xúc với các tế bào miễn dịch. Dựa trên các ứng dụng tin sinh học, peptide PEP thuộc cấu trúc Hsp60, được dự đoán là có khả năng tương tác với PrPC (dữ liệu không được trình bày). Peptide nhỏ này dễ dàng dung hợp, không ảnh hưởng tới khả năng sinh miễn dịch kháng nguyên, nhưng vẫn giữ được khả năng định hướng tế bào M. Trong các chiến lược phát triển vaccine uống, *Saccharomyces cerevisiae* đã được sử dụng như một thể mang bảo vệ kháng nguyên khỏi điều kiện khắc nghiệt nhờ khả năng tồn tại lâu trong hệ tiêu hóa<sup>17,18</sup>. Bên cạnh hệ thống vận chuyển, tá được là một thành phần quan trọng trong vaccine uống. Các gốc đường hóa mannose của *S. cerevisiae* có thể sử dụng như một tá được khi được nhận diện là phân tử kiểu mẫu (Pathogen-associated molecular pattern) bởi Toll-like receptor, cung cấp tín hiệu thứ hai cho đáp ứng miễn dịch. Hệ thống kháng nguyên định hướng tế bào M, được bảo vệ và vận chuyển bởi *S. cerevisiae* là hệ thống vaccine giàu tiềm năng. Với mục tiêu xây dựng hệ thống vaccine uống phòng ngừa chủng ETEC/F18, protein dung hợp PEP-F18 được cấu trúc và biểu hiện trên bề mặt tế bào nấm men *S. cerevisiae* MT8-1 khuyết dưỡng tryptophan. Đây là nguyên liệu ban đầu cho các nghiên cứu về khả năng định hướng, cũng như hiệu quả sinh miễn dịch của PEP-F18.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Chủng chủ và plasmid

Chủng *E. coli* DH5 $\alpha$  được sử dụng làm chủng để nhân bản plasmid tái tổ hợp. Chủng *S. cerevisiae* MT8-1 được sử dụng làm chủng biểu hiện protein tái tổ hợp. Plasmid pGM1F1 được sử dụng để dòng hóa có nguồn gốc từ plasmid gốc pCMC11 (Trường Đại học Kyoto, Nhật Bản), với một số biến đổi phù hợp với nhu cầu dòng hóa và biểu hiện protein. Plasmid pET22b-*pep-f18* được sử dụng làm khuôn thu nhận gene *pep-f18*,

với kích thước 492 bp<sup>19</sup>. Chủng *E. coli* DH5 $\alpha$ , *S. cerevisiae* MT8-1 và các plasmid được cung cấp bởi nhóm nghiên cứu Y sinh học GMIF, Bộ môn Công nghệ Sinh học Phân tử và Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-TPHCM.

### Cấu trúc plasmid tái tổ hợp pGMIF1-pep-f18

Plasmid được thu nhận bằng phương pháp SDS-kiểm. Sinh khối *E. coli* DH5 $\alpha$  mang plasmid pGMIF1 được thu nhận và phá màng bằng SDS, NaOH được bổ sung để biến tính DNA, cuối cùng KOAc được bổ sung để giúp plasmid hồi tính và hoà tan vào dịch, trong khi DNA bộ gene và hỗn hợp protein bị tủa. Phần dịch chứa pGMIF1 được thu nhận, chuyển lên cột EZ-10 và rửa nhiều lần để loại bỏ các tạp chất còn lại. Thông qua kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu, gene *pep-f18* được thu nhận từ khuôn mẫu là plasmid pET22b-*pep-f18*. Ngoài thu nhận gene mục tiêu, cặp mồi đặc hiệu 285FsacII (CCGCGGAGATG-GCTACTTTAGTTGTTAAT) và 286RXhoI (GCTC-GAGCCCTTGTAAGTAACCGCGTAAG) được thiết kế nhằm bổ sung vị trí của enzyme cắt giới hạn SacII và XhoI lên hai đầu của sản phẩm PCR. Quy trình dòng hoá được thực hiện theo quy trình AIO<sup>20</sup>. Đầu tiên, gene *pep-f18* và plasmid pGMIF1 cùng được xử lý với cặp enzyme cắt giới hạn SacII và XhoI (Thermo Scientific); sau đó, hỗn hợp sản phẩm cắt được nối lại bằng enzyme nối T4 DNA Ligase (Thermo Scientific); cuối cùng, hỗn hợp được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$  khả nạp bằng phương pháp hoá biến nạp-sốc nhiệt, đối chứng âm là chủng *E. coli* DH5 $\alpha$  không được biến nạp hỗn hợp sản phẩm cắt-nối. Các vi khuẩn được nuôi trên đĩa thạch LB-Amp (cao nấm men: 5 g/L, peptone: 10 g/L, NaCl: 10 g/L, agarose: 15 g/L, ampicillin: 100  $\mu$ g/mL). Sau 16 giờ, các khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch được sàng lọc bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc với một mồi đặc hiệu (285FsacII) và một mồi trên plasmid pGMIF1 (GMIF1R: GTAGTGGTTGATGATAAAAGAGCTTTTGGC), đối chứng âm được sử dụng là plasmid pGMIF1. Plasmid trong các khuẩn lạc dương tính được thu nhận và tiến hành giải trình tự.



**Hình 1:** Trình tự của cassette gene biểu hiện protein PEP-F18 trên bề mặt tế bào nấm men [Nguồn: Nhóm tác giả]

### Tạo chủng nấm men *S. cerevisiae* tái tổ hợp chứa pGMIF1-pep-f18

Sau khi thu nhận bằng phương pháp SDS-kiểm, plasmid pGMIF1-*pep-f18* được xử lý với enzyme cắt giới hạn *AhdI* nhằm tạo DNA mạch thẳng, điều này giúp plasmid dễ dàng tái tổ hợp vào bộ gene *S. cerevisiae*. Sau khi tinh sạch, plasmid được biến nạp vào tế bào nấm men *S. cerevisiae* bằng phương pháp điện biến nạp với thông số 400 mA, 1500 V, 5 ms. Sản phẩm biến nạp được nuôi cấy trên đĩa thạch SD-tryp khuyết đường tryptophan (Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids: 6,7 g/L (HiMedia), D-glucose: 20 g/L, Complete Supplement Mixture w/o HIS-TRYP: 0,72 g/L (HiMedia), L-Histidine HCl: 20 mg/L, agarose: 15 g/L) để sàng lọc các dòng nấm men mang plasmid, đối chứng âm là chủng *S. cerevisiae* MT8-1 không được biến nạp plasmid. Các khuẩn lạc sau đó được sàng lọc bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi trên gene (285FSacII) và mồi trên plasmid pGMIF1 (GMIF1R), đối chứng dương là plasmid pGMIF1-*pep-f18*, đối chứng âm là plasmid pGMIF1. Khuẩn lạc dương tính được cấy tăng sinh trong YPD lỏng (D-glucose: 20 g/L, peptone: 20 g/L, cao nấm men: 10 g/L) ở 30 °C, trong 48 giờ.

### Kiểm tra biểu hiện protein PEP-F18

**Kiểm tra bằng điện di SDS - PAGE và lai Western Blot**  
Sau 48 giờ nuôi cấy, sinh khối nấm men được thu nhận và phá bằng phương pháp siêu âm (sonication) kết hợp enzyme Lyticase. Sau khi ly tâm, các phân đoạn protein tổng, tan, tủa được thu nhận, xử lý và điện di SDS-PAGE nhuộm Coomassie Blue, và lai Western Blot.

Ở phương pháp SDS-PAGE kết hợp Coomassie Blue, sau khi ủ với thuốc nhuộm 1 giờ, gel acrylamide được giải nhuộm bằng dịch giải nhuộm (acetic acid: 50 mL, ethanol: 50 mL, H<sub>2</sub>O: 400 mL). Với thí nghiệm lai Western Blot, sau khi thực hiện trên gel polyacrylamide, các protein được hóa chuyển thấm sang màng nitrocellulose. Sau khi khoá bằng dung dịch BSA 5% và rửa nhiều lần bằng PBS-T (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 11,5 g/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 2,96 g/L, NaCl: 5,84 g/L, Tween-20: 0,05%), màng được ủ với kháng thể sơ cấp độ pha loãng 1: .000 trong PBS-T, và kháng thể thứ cấp ở độ pha loãng 1: 10.000 trong PBS-T. Kháng thể sơ cấp là kháng huyết thanh kháng F18 thu nhận từ heo (Đại học Gent, Vương quốc Bỉ), kháng thể thứ cấp là kháng thể Goat anti-pig liên hợp Horseradish peroxidase (HRP) (Santa Cruz). Cuối cùng, cơ chất 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) được bổ sung để kiểm tra sự biểu hiện của protein mục tiêu.

#### Kiểm tra bằng Dot Blot

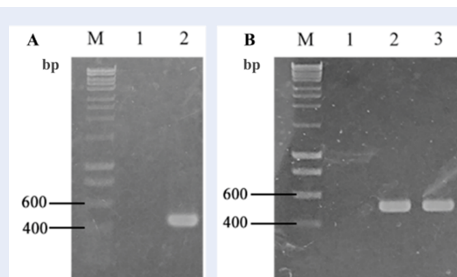
Tương tự lai Western Blot, kỹ thuật Dot Blot giúp xác định sự hiện diện của protein trong hỗn hợp thông

qua tương tác kháng nguyên-kháng thể. Ở nghiên cứu này, Dot Blot được áp dụng với đối tượng là tế bào nấm men nguyên vẹn về mặt cấu trúc. Màng nitrocellulose được khóa bằng BSA 5% trong 1 giờ. Sau đó, các chủng nấm men được chuyển lên bề mặt tại các điểm cố định. Các tế bào nấm men nguyên vẹn được ủ chung với kháng thể sơ cấp là kháng huyết thanh kháng F18 thu nhận từ heo (Đại học Gent, Vương quốc Bỉ), kháng thể thứ cấp là kháng thể Goat anti-pig liên hợp HRP (Santa Cruz). Sau nhiều bước rửa bằng PBS-T, cơ chất TMB được sử dụng để kiểm tra sự hiện diện của protein. Chỉ các tế bào biểu hiện protein mục tiêu trên bề mặt mới được kháng thể nhận diện và phát tín hiệu.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Cấu trúc plasmid tái tổ hợp pGMIF1-pep-f18

Dựa trên khuôn mẫu là pET22b-pep-f18, gene *pep-f18* (492 bp), mã hóa cho protein PEP-F18, được thu nhận bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu, trình tự cắt giới hạn của enzyme *SacII* và *XhoI* được bổ sung vào đầu 5' và 3' của gene. Kết quả điện di trên gel agarose 1,5% cho thấy vạch gene *pep-f18* (Hình 2A, giếng 2) nằm giữa hai vạch Ladder 400 và 600 bp, phù hợp với kích thước thiết kế là 492 bp. Đối chứng âm, không có khuôn mẫu, không xuất hiện vạch cho thấy không có sự tạp nhiễm (Hình 2A, giếng 1).



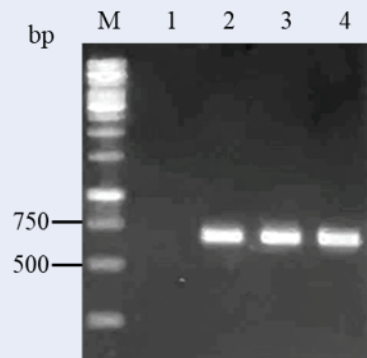
**Hình 2:** PCR thu gene *pep-f18*(A). M, Ladder DNA 1 kb (HyperLadder, Bioline); 1, đối chứng âm; 2, gene *pep-f18*, PCR sàng lọc khuẩn lạc (B). M, Ladder DNA 1 kb; 1, đối chứng âm; 2-3, sản phẩm PCR khuẩn lạc. [Nguồn: Nhóm tác giả]

Gene và plasmid sau khi cắt với enzyme cắt giới hạn (*SacII* và *XhoI*) được nối với nhau bằng enzyme T4 DNA Ligase. Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 $\alpha$  khả nạp, và trải trên đĩa LB-Amp. Do plasmid pGMIF1 được thiết kế có gene kháng ampicillin, những tế bào tiếp nhận plasmid tái tổ hợp mới có khả năng kháng ampicillin và mọc được trên đĩa thạch. Từ đĩa biến nạp, các khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên để tiến hành sàng lọc bằng PCR với một

mồi đặc hiệu trên gene (285FSacII) và một mồi trên plasmid (GMIF1R), đối chứng âm là plasmid pGMIF-1. Các khuẩn lạc chứa plasmid tái tổ hợp theo đúng thiết kế cho sản phẩm có kích thước 533 bp, khuẩn lạc không chứa gene mục tiêu sẽ không xuất hiện vạch. Kết quả điện di trên gel agarose 1,5% cho thấy vạch sáng nằm giữa hai vạch 400 và 600 bp, phù hợp với thiết kế (Hình 2B, giếng 2 và 3), đối chứng âm không có sự xuất hiện của bất kỳ vạch sáng nào (Hình 2B, giếng 1). Kết quả giải trình tự cho thấy sự tương đồng 100%, đồng khung dịch mã với trình tự thiết kế (Kết quả không được trình bày).

### Tạo chủng nấm men *S. cerevisiae* tái tổ hợp chứa pGMIF1-pep-f18

Sau khi cắt mở vòng bằng *AhaI*, plasmid tái tổ hợp pGMIF1-pep-f18 được chuyển vào chủng nấm men *S. cerevisiae* bằng điện biến nạp, và nuôi cấy trên môi trường SD-tryp khuyết dưỡng tryptophan. Chỉ những tế bào tiếp nhận và tái tổ hợp pGMIF1-pep-f18 vào bộ gene mới có khả năng tổng hợp tryptophan, và mọc trên môi trường khuyết dưỡng. Tiếp theo, PCR khuẩn lạc với cặp mồi 285FSacII và GMIF1R được tiến hành với sự hỗ trợ của enzyme *Lyticase*. Tương tự kết quả PCR khuẩn lạc ở vi khuẩn, bằng gel điện di cho thấy đối chứng âm, bổ sung plasmid pGMIF1 không xuất hiện vạch (Hình 3, giếng 1), cả chủng dương chứa plasmid tái tổ hợp (Hình 3, giếng 2) và các khuẩn lạc sàng lọc (Hình 3, giếng 3, 4) đều xuất hiện vạch sáng nằm giữa giữa vạch 500 và 750 bp của Ladder. Kết quả trên cho thấy chủng *S. cerevisiae*::pGMIF1-pep-f18 đã được tạo thành công, sẵn sàng cho việc biểu hiện protein.



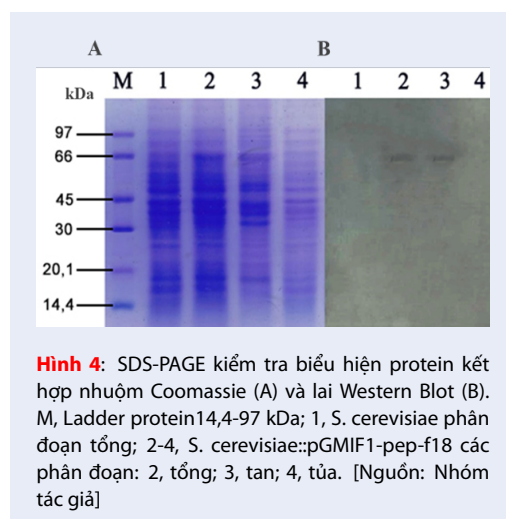
**Hình 3:** PCR sàng lọc khuẩn lạc. M, Ladder DNA 1 kb (Thermo); 1, đối chứng âm; 2, đối chứng dương; 3, 4, sản phẩm PCR khuẩn lạc. [Nguồn: Nhóm tác giả]



## KIỂM TRA BIỂU HIỆN PROTEIN PEP-F18

### Kiểm tra bằng SDS-PAGE và Western Blot

Sau khi được nuôi cấy ở 30°C, trong 48 giờ, nấm men *S. cerevisiae*::pGMIF1-*pep-f18* được thu nhận và phá bằng sóng siêu âm kết hợp Lyticase. Các phân đoạn tổng, tan, của protein được điện di trên gel polyacrylamide. Kết quả SDS-PAGE kết hợp Coomassie cho thấy, ở phân đoạn tổng, và tan của *S. cerevisiae*::pGMIF1-*pep-f18* có vạch protein ở gần vạch 66 kDa của Ladder, tương đồng với kích thước dự đoán (khoảng 62 kDa) (Hình 4A, giếng 2, 3), vạch này xuất hiện ở phân đoạn tan mà không có ở phân đoạn tủa (Hình 4A, giếng 3, 4). Không có sự xuất hiện của vạch protein này ở chủng *S. cerevisiae* (Hình 4A, giếng 1). Để xác định đây là protein PEP-F18, Western sẽ được thực hiện với kháng thể kháng F18.



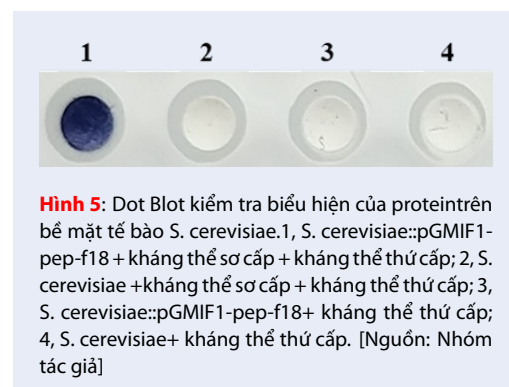
Ở phương pháp Western Blot, kháng huyết thanh kháng F18 thu từ heo được sử dụng để khẳng định sự biểu hiện của PEP-F18. Tín hiệu trên màng nitrocellulose (Hình 4B) cho thấy có các vạch protein với kích thước tương đương với kích thước vạch protein nghi ngờ ở hình nhuộm Coomassie (Hình 4B, giếng 2, 3). Từ hai kết quả này, có thể kết luận rằng vạch protein nghi ngờ là protein PEP-F18.

Ở các thử nghiệm miễn dịch, việc sử dụng kháng thể đặc hiệu là cần thiết. Với kháng nguyên F18, kháng thể đặc hiệu chưa được thương mại hoá, do đó kháng huyết thanh kháng F18 là lựa chọn tối ưu. Kết quả lai Western Blot đã cho thấy kháng huyết thanh kháng F18 không nhận diện và tương tác với các thành phần khác của tế bào nấm men ở độ pha loãng 1:1000. Do đó, độ pha loãng này sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo nhằm tránh hiện tượng dương tính giả (kháng huyết

thanh kháng F18 có thể nhận diện các thành phần khác ngoài F18).

### Kiểm tra bằng phương pháp Dot Blot

Sau khi nuôi cấy lắc ở 30°C, trong 48 giờ, chủng nấm men *S. cerevisiae*::pGMIF1-*pep-f18* được thu nhận. Sự biểu hiện của protein trên bề mặt tế bào được phân tích bằng kỹ thuật Dot Blot. Ở thí nghiệm này, tế bào nấm men không xử lý tăng tính thấm của vách để giữ nguyên vẹn về mặt cấu trúc, tránh các kháng thể có thể đi vào bên trong tế bào chất. Do đó, các kháng thể chỉ có thể tương tác với các thành phần trên bề mặt tế bào nấm men. Tín hiệu trên màng nitrocellulose cho thấy chỉ có chủng *S. cerevisiae*::pGMIF1-*pep-f18* phát tín hiệu màu của phản ứng HRP-TMB (Hình 5, điểm 1). Tín hiệu này cho thấy kháng huyết thanh kháng F18 từ heo, cụ thể là kháng thể kháng F18 đã tương tác với kháng nguyên F18 và được giữ lại trên bề mặt tế bào. Các mẫu còn lại đều không thấy tín hiệu, điều này cho thấy không có hoặc có rất nhỏ (tín hiệu không thể nhìn thấy bằng mắt thường) tương tác giữa kháng huyết thanh với các thành phần khác trên bề mặt tế bào nấm men/màng nitrocellulose (Hình 5, điểm 2-4).



Thông qua các kỹ thuật tạo dòng, biểu hiện và đánh giá, chúng tôi đã thành công trong việc hiện protein PEP-F18 trên bề mặt chủng nấm men *S. cerevisiae*. Tuy nhiên, các kết quả này mới dừng lại ở mức định tính, chưa xác định cường độ biểu hiện cũng như sự phân bố của protein trên bề mặt tế bào. Các thông tin này cần được kiểm tra, xác định bằng nhuộm miễn dịch huỳnh quang hoặc phân tích tế bào theo dòng chảy trước khi tiến hành đánh giá khả năng định hướng của peptide PEP và tính sinh miễn dịch của chủng nấm men. Cùng PEP-F18 dạng tan ở vi khuẩn *E. coli*, F18 trên bề mặt nấm men *Pichia pastoris*, PEP-F18 trên nấm men *S. cerevisiae* sẽ là nguồn nguyên liệu cho thí nghiệm kiểm tra, so sánh khả năng kích thích sinh miễn dịch trên mô hình động vật trong các nghiên cứu tiếp theo<sup>19,21</sup>.

## KẾT LUẬN

Plasmid tái tổ hợp pGMIF1-*pep-f18* mã hóa cho protein PEP-F18 đã được cấu trúc thành công, trong đó peptide PEP có nguồn gốc từ Hsp60 và F18 là kháng nguyên mục tiêu từ ETEC. Xây dựng thành công chủng *S. cerevisiae* mang plasmid pGMIF1-*pep-f18*, biểu hiện protein tái tổ hợp PEP-F18 trên bề mặt tế bào. Chủng nấm men này là nguồn nguyên liệu ban đầu cho mục tiêu phát triển vaccine uống định hướng tế bào M.

## XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả tuyên bố rằng họ không có xung đột lợi ích.

## TUYÊN BỐ ĐÓNG GÓP CỦA TÁC GIẢ

Lê Văn Ngọc Trân, Mai Quốc Gia, Trần Văn Hiếu tiến hành thiết kế thí nghiệm, thu thập số liệu, xử lý kết quả, tham gia viết bài.

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (ĐHQG-HCM) trong khuôn khổ Đề tài mã số 36-2025-18-03. Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn GS. Eric Cox, Đại học Gent, Vương quốc Bỉ đã cung cấp kháng thể sơ cấp là kháng huyết thanh heo kháng F18.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Holland RE. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. Clin Microbiol Rev. 1990;3(4):345–375. Available from: <https://doi.org/10.1128/CMR.3.4.345>.
- Rhouma M, Fairbrother JM, Beaudry F, Letellier A. Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. Acta Veterinaria Scandinavica. 2017;59(1):31. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0299-7>.
- Do TN, Cu PH, Nguyen HX, Au TX, Vu QN, Driesen SJ. Pathotypes and serogroups of enterotoxigenic Escherichia coli isolated from pre-weaning pigs in north Vietnam. J Med Microbiol. 2006;55:93–99. Available from: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46247-0>.
- Fairbrother JM, Nadeau E, Gyles CL. Escherichia coli in post-weaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. Anim Health Res Rev. 2006;6(1):17–39. Available from: <https://doi.org/10.1079/ahr.2005105>.
- Xia P, Zou Y, Wang Y, Song Y, Liu W, Francis DH, et al. Receptor for the F4 fimbriae of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC). Appl Microbiol Biotechnol. 2015;99(12):4953–4959. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6643-9>.
- Luppi A, Gibellini M, Gin T, Vangroenweghe F, Vandenbroucke V, Bauerfeind R. Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic Escherichia coli isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe. Porcine Health Manag. 2016;2(20). Available from: <https://doi.org/10.1186/s40813-016-0039-9>.
- Nguyen NT, Nguyen HM, Nguyen CV, Nguyen TV, Nguyen MT, Thai HQ. Use of colistin and other critical antimicrobials on pig and chicken farms in Southern Vietnam and its association

with Resistance in Commensal Escherichia coli Bacteria. Appl Environ Microbiol. 2016;82(13):3727–3735. Available from: <https://doi.org/10.1128/AEM.00337-16>.

- Ruan X, Zhang W. Oral immunization of a live attenuated Escherichia coli strain expressing a holotoxin-structured adhesin-toxin fusion (1FaeG-FedF-LTA<sub>2</sub>-5LTB) protected young pigs against enterotoxigenic E. coli (ETEC) infection. Vaccine. 2013;31(11):1458–1463. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.01.030>.
- Fairbrother JM, Nadeau E, Belanger L, Tremblay CL, Tremblay D, Brunelle M. Immunogenicity and protective efficacy of a single-dose live non-pathogenic Escherichia coli oral vaccine against F4-positive enterotoxigenic Escherichia coli challenge in pigs. Vaccine. 2017;35(2):353–360. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.11.045>.
- Verdonck F, Tiels P, Van Gog K, Goddeeris BM, Lycke N, Clements J, et al. Mucosal immunization of piglets with purified F18 fimbriae does not protect against F18+ Escherichia coli infection. Vet Immunol Immunopathol. 2007;120(3-4):69–79. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.06.018>.
- Van Den Broeck W. Induction of immune responses in pigs following oral administration of purified F4 fimbriae. Vaccine. 1999;17((15-16)):2020–2029. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(98\)00406-x](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(98)00406-x).
- Van Der Stede Y, Cox E, Verdonck F, Vancaeneghem S, Goddeeris BM. Reduced faecal excretion of F4+E coli by the intramuscular immunisation of suckling piglets by the addition of 1-alpha-2,5-dihydroxyvitamin D3 or CpG-oligodeoxynucleotides. Vaccine. 2003;21(9):1023–1032. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00553-4](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00553-4).
- Zhu Q, Berzofsky JA. Oral vaccines: directed safe passage to the front line of defense. Gut Microbes. 2013;4(3):246–252. Available from: <https://doi.org/10.4161/gmic.24197>.
- Stokes CR, M B, AD W. Immunology of the porcine gastrointestinal tract. Vet Immunol Immunopathol. 1994;43(1-3):143–150. Available from: [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(94\)90130-9](https://doi.org/10.1016/0165-2427(94)90130-9).
- Kim SH, Jang YS. The development of mucosal vaccines for both mucosal and systemic immune induction and the roles played by adjuvants. Clin Exp Vaccine Res. 2017;6(1):15–21. Available from: <https://doi.org/10.7774/cevr.2017.6.1.15>.
- Edenhofer F, Rieger R, Famulok M, Wendler W, Weiss S, Winkacker EL. Prion protein PrPc interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. J Virol. 1996;70(7):4724–4728. Available from: <https://doi.org/10.1128/JVI.70.7.4724-4728.1996>.
- Schreuder MP, Deen C, Boersma WJ, Pouwels PH, Klis FM. Yeast expressing hepatitis B virus surface antigen determinants on its surface: implications for a possible oral vaccine. Vaccine. 1996;14(5):383–388. Available from: [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(95\)00206-g](https://doi.org/10.1016/0264-410x(95)00206-g).
- Blanquet S, Antonelli R, Laforet L, Denis S, Marol-Bonnin S, Alric M. Living recombinant Saccharomyces cerevisiae secreting proteins or peptides as a new drug delivery system in the gut. J Biotechnol. 2004;110(1):37–49. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.01.012>.
- MQ G, NTP T, TV H. Tạo dòng, biểu hiện kháng nguyên F18 dung hợp peptide định hướng tế bào M. Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ. 2023;59(3):79–85. Available from: <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2023.1352023>.
- Gia MQ, Vo-My Nguyen VN, Tran T, Tran-Van H. All-in-One MolecularCloning as a New Gene Manipulation Method. Journal of Applied Biotechnology Reports. 2022;9(1):511–515. Available from: <https://doi.org/10.30491/JABR.2021.289097.1395>.
- Gia MQ, Trần LVN, Hiếu T, H. Tạo dòng, biểu hiện nhân tố bám dính F18 trên bề mặt tế bào nấm men Pichia pastoris. Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ. 2020;56(6):139–145. Available from: <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2020.152>.

# Cloning and surface expression of antigen F18 fused with M-cell targeting peptide on *Saccharomyces cerevisiae* cell wall

Le Van Ngoc Tran, Mai Quoc Gia, Tran Van Hieu\*



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

## ABSTRACT

Post-weaning diarrhea (PWD) is one of the most common diseases damaging the swine industry. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is the main pathogen associated with PWD in piglets. The most important virulence is adhesion factors and enterotoxin. F4 and F18 are the two fimbriae frequently detected in ETEC. Vaccines offer a powerful, cost-effective and possible approach to protect pigs against ETEC. Recently, ETEC/F4 vaccine was available for commercial. On the other hand, ETEC/F18 vaccine still has to face many difficulties in development. To solve these problems, F18 antigene was fused to M-cell targeting protein PEP and displayed on *Saccharomyces cerevisiae* surface. This fusion was constructed by inserting the coding gene of pep-f18 into pGMIF1 plasmid. The recombinant plasmid named pGMIF1-pep-f18 was electroporated into a tryptophan auxotrophic *Saccharomyces cerevisiae* MT8-1 strain and was induced by glucose. The results showed that PEP-F18 protein was successfully expressed on the yeast cell surface, thus, succeeding in cloning an *S. cerevisiae* strain that expresses PEP- F18 on its cell wall. This was a starting material for later immunological evaluation.

**Key words:** Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), F18, oral vaccine, PEP, *Saccharomyces cerevisiae*

Faculty of Biology and Biotechnology,  
University of Science, VNU-HCM

## Correspondence

**Tran Van Hieu**, Faculty of Biology and  
Biotechnology, University of Science,  
VNU-HCM

Email: Faculty of Biology and  
Biotechnology

## History

- Received: 30-06-2025
- Revised: 31-12-2025
- Accepted: 10-02-2026
- Published Online: 17-06-2026

## DOI :

<https://doi.org/10.32508/vnuhcmjarns.v10i2.1461>



## Copyright

© VNUHCM Journal. This is an  
open-access article distributed  
under the terms of the Creative  
Commons Attribution 4.0  
International license.

**Cite this article :** Tran L V N, Gia M Q, Hieu T V. Cloning and surface expression of antigen F18 fused with M-cell targeting peptide on *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. VNUHCM J. Adv. Res. Nat. Sci. 2026; 10(2):3620-3626.