



Original Article

# Expression of some Serine Protease Encoding Genes and Trypsin-like Protease Activity in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Infected with White Spot Syndrome Virus

Le The Thai, Quach Hong Thai, Nguyen Thi Hong Loan\*

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

Received 20 July 2022

Revised 07 September 2022; Accepted 09 September 2022

**Abstract:** In this study, trypsin-like protease activity and expression of serine protease encoding genes (*PmPPAE1*, *PmPPAE2* - clip-serine proteases and *PmTLP1*, *PmTLP2* - trypsin-like proteases) in the different tissues of black tiger shrimp were determined. The expression level of *PmPPAE1* and *PmPPAE2* was the highest in the hemolymph; meanwhile that of *PmTLP1* and *PmTLP2* was the highest in the hepatopancreas. In the hemolymph of white spot syndrome virus (WSSV)-injected shrimp, the expression of *PmPPAE1*, *PmPPAE2* and *PmTLP2* genes was upregulated by 2.32, 2.57 and 4.56-fold, respectively, whereas the expression of *PmTLP1* was downregulated by 1.47-fold relative to the control group (injected with phosphate buffered saline). In the hepatopancreas of WSSV-injected shrimp, the expression levels of *PmPPAE1*, *PmPPAE2* increased by 2.24 and 3.99-fold, respectively, and that of *PmTLP1* and *PmTLP2* decreased by 1.51 and 1.29-fold, respectively. Trypsin-like protease activity was found increased 3.25-fold and decreased 4.1-fold, in the hemolymph and hepatopancreas of WSSV-infected shrimp, respectively. These data indicate the role of serine proteases in immune response of the shrimp.

**Keywords:** Clip-serine protease, *Penaeus monodon*, serine protease, trypsin-like protease, WSSV.

\* Corresponding author

E-mail address: loannnguyen@hus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5491>

# Mức độ biểu hiện của một số gen mã hóa cho serine protease và hoạt độ trypsin-like protease của tôm sú (*Penaeus monodon*) bị nhiễm virus đốm trắng

Lê Thế Thái, Quách Hồng Thái, Nguyễn Thị Hồng Loan \*

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

Nhận ngày 20 tháng 7 năm 2022

Chỉnh sửa ngày 07 tháng 9 năm 2022; Chấp nhận đăng ngày 09 tháng 09 năm 2022

**Tóm tắt:** Trong nghiên cứu này, sự biểu hiện của các gen mã hoá serine protease bao gồm hai gen mã hoá clip-serine protease (*PmPPAE1*, *PmPPAE2*), hai gen mã hoá trypsin-like protease (*PmTLP1*, *PmTLP2*) và hoạt độ trypsin-like protease trong một số bộ phận khác nhau của tôm sú nhiễm virus đốm trắng (white spot syndrome virus - WSSV) đã được phân tích. Kết quả cho thấy *PmPPAE1* và *PmPPAE2* biểu hiện cao nhất trong huyết tương; trong khi đó, *PmTLP1* và *PmTLP2* biểu hiện cao nhất trong gan tụy của tôm sú. Khi tôm sú bị nhiễm WSSV, mức độ biểu hiện của các gen *PmPPAE1*, *PmPPAE2* và *PmTLP2* trong huyết tương tăng lần lượt là 2,32; 2,57 và 4,56 lần; và mức độ biểu hiện của *PmTLP1* giảm 1,47 lần so với nhóm tôm đối chứng (chỉ tiêm đệm phosphate chứa muối-PBS). Trong gan tụy của tôm nhiễm WSSV, mức độ biểu hiện của các gen *PmPPAE1*, *PmPPAE2* cũng tăng lần lượt là 2,24 và 3,99 lần và mức độ biểu hiện của *PmTLP1* và *PmTLP2* giảm lần lượt là 1,51 và 1,29 lần so với đối chứng. Hoạt độ trypsin-like protease tăng 3,25 lần và giảm 4,1 lần tương ứng trong huyết tương và gan tụy của tôm sú nhiễm WSSV so với nhóm đối chứng. Kết quả nghiên cứu này cho thấy vai trò của các serine protease trong đáp ứng miễn dịch của tôm sú khi nhiễm WSSV.

**Từ khóa:** Clip-serine proteases, *Penaeus monodon*, serine protease, trypsin-like protease, WSSV.

## 1. Mở đầu

Ngành nuôi tôm mang lại lợi ích kinh tế quan trọng ở các nước nhiệt đới. Tuy nhiên, dịch bệnh trong đó có bệnh do virus đốm trắng (White spot syndrome virus - WSSV) gây ra là nguyên nhân chính thường gây thiệt hại lớn đến sản lượng tôm. Vì vậy, việc kiểm soát dịch bệnh của tôm là hết sức cần thiết [1]. Nghiên cứu về đáp ứng miễn dịch ở tôm là cơ sở để phát triển các biện pháp kiểm soát dịch bệnh hiệu quả. Tôm chỉ có hệ thống miễn dịch bẩm sinh, trong đó hệ thống hoạt hoá prophenoloxidase (proPO) tạo phenoloxidase hoạt động (PO) có vai trò quan trọng [2].

Serine protease là một trong những họ protease lớn nhất trong giới động vật thực hiện nhiều chức năng quan trọng khác nhau từ tiêu hoá thức ăn đến đáp ứng miễn dịch [3]. Trypsin hay trypsin-like protease (TLP) là một enzyme điển hình thuộc nhóm serine protease, enzyme này có ba gốc axit amin là histidine, aspartic và serine trong trung tâm hoạt động, phân giải cơ chất đặc hiệu BapNA và bị ức chế mạnh bởi N- $\alpha$ -tosyl-L-lysiny-chloromethylketone (TLCK) [4].

Các gen mã hóa serine protease được nghiên cứu nhiều là thuộc họ Clip-serine protease (Clip-SP), có vai trò hoạt hoá proPO thành PO, còn được gọi là PPAE (proPO - activating enzyme). Clip-SP có 2 miền chính: trypsin protease chứa trung tâm hoạt động với bộ ba axit amin tương tự như các trypsin và miền Clip với trình tự 6 gốc cysteine tạo thành 3 cầu disulfide [2, 5-7].

\* Tác giả liên hệ

Địa chỉ email: loannnguyen@hus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5491>

Nhiều loại trypsin và TLP của tôm đã được phát hiện và có mặt chủ yếu trong gan tụy với khối lượng phân tử (KLPT) trong khoảng 11 kDa đến 50 kDa [8-12]. Trypsin hay TLP được tổng hợp ban đầu ở dạng zymogen trước khi được tiết và hoạt hoá trong tuyến tiêu hoá như đã được thấy ở tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* [10]. Ở tôm, vai trò chính của TLP được biết đến là phân giải protein trong thức ăn, giúp cho quá trình tiêu hóa của tôm dễ dàng hơn [13, 14], tham gia vào hệ thống hoạt hoá proPO [2, 5, 7] và quá trình đáp ứng miễn dịch [3, 15].

Phân tích trình tự một số gen mã hoá các TLP (XM\_027367621, JQ277721 và X86369) của tôm thẻ chân trắng bằng công cụ Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) cho thấy các gen này đều mã hóa cho một số trypsin với trình tự 266 axit amin và KLPT khoảng 28 kDa [13]. Ngoài ra, khi tiến hành so sánh các trình tự trên với hệ gen của tôm sú đã cho thấy có sự tương đồng khoảng 90% với gen mã hóa trypsin của tôm sú (XM\_037920629 - XM\_037920635). Ở tôm trắng Trung Quốc *Fenneropenaeus chinensis*, 4 gen mã hóa các trypsin-like serine protease với KLPT khoảng 25 kDa, lần lượt kí hiệu là *FcTry1*, *FcTry2*, *FcTry3* và *FcTry4* được biết có biểu hiện trong gan tụy và mức độ biểu hiện của chúng thay đổi khi tôm bị nhiễm WSSV [3]. Phân tích trình tự gen và axit amin của 4 protein *FcTry1*- *FcTry4* cho thấy có độ tương đồng cao, tương ứng khoảng 80% và 90% với trình tự gen và axit amin của TLP ở tôm sú. Trong khi đó, trình tự axit amin của protein mã hóa bởi gen *PmPPAE1* (ACP19558.1) [5] chỉ tương đồng rất thấp (38,06%) với TLP của tôm sú. Như vậy, dù có chung miền trypsin protease nhưng chúng vẫn mã hóa cho các serine protease khác nhau. Trên cơ sở các nghiên cứu về các gen mã hóa serine protease của tôm đã được công bố và phân tích với trình tự gen của tôm sú, chúng tôi đã lựa chọn hai gen mã hoá các Clip-SP là *PmPPAE1* và *PmPPAE2* [5, 6] và hai gen mã hoá TLP được ký hiệu trong nghiên cứu này là *PmTLP1* và *PmTLP2* để đánh giá mức độ biểu hiện của chúng khi tôm sú bị nhiễm WSSV.

## 2. Thực nghiệm

### 2.1. Nguyên liệu

Tôm sú (20-25 g/con) từ đầm tôm nuôi quảng canh tại cảng Đình Vũ, Hải An, Hải Phòng.

Các hóa chất enzyme phiên mã ngược M-MLV, nTaq-HOT được mua từ Enzyomic (Hàn Quốc); bộ kit tách RNA Easy-spin™ Total RNA Extraction Kit được mua từ iNtRON (Hàn Quốc); master mix SensiFAST™ SYBR Lo-ROX được mua từ (Bioline, UK); các cặp mồi được đặt hàng từ Phù Sa (Việt Nam). Các hóa chất còn lại đều được mua từ các hãng tin cậy và đạt độ tinh khiết phân tích.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

*Giải phẫu tôm và thu thập các bộ phận:* tôm sú sống được giải phẫu để thu các bộ phận: gan tụy, cơ đầu, cơ thân và huyết tương. Mẫu được nghiền trong nitơ lỏng bằng cối chày sứ và đồng nhất trong đệm Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM (đệm A) theo tỉ lệ 1 g mẫu: 3 mL đệm. Dịch đồng nhất sau đó được ly tâm ở 12000 vòng/phút ở 4 °C trong 30 phút để thu dịch nổi. Huyết tương được hút ra từ phần dưới đốt bụng thứ hai của tôm bằng xi lanh 1 mL đã có sẵn 0,1 mL đệm A. Các dịch chiết được bảo quản ở -80 °C cho đến khi sử dụng.

*Thu mẫu WSSV và định lượng virus:* phần đầu của tôm nhiễm WSSV (cung cấp bởi Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản 2) được nghiền đến đồng nhất trong đệm TN (Tris-HCl 10 mM và NaCl 10 mM pH 7,5) theo tỷ lệ 1 g mẫu: 1 mL đệm. Dịch nghiền được ly tâm 3500 vòng/phút, 4 °C, 15 phút để thu dịch nổi có WSSV. DNA của virus WSSV trong dịch nổi được tách chiết bằng Viral gene-spin Viral DNA/RNA extraction kit (iNtRON, Hàn Quốc) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Số bản sao của WSSV được định lượng bằng phản ứng real-time PCR trên cơ sở nhân bản đoạn gen đặc hiệu 126 bp (nucleotide 281344 - 281469) trên hệ gen WSSV (mã số KU216744.2) với cặp mồi WSSV-Fw: 5'-ACTAGGCTCTGACGACCTCT-3'; WSSV-Rv: 5'-ACGGCATTCTTCATGGCTTC-3' và mẫu chuẩn là plasmid pGEM tái tổ hợp mang

đoạn gen 126 bp có nồng độ  $3 \times 10^2$ - $3 \times 10^8$  bản sao/mL.

**Tách chiết tổng số RNA:** RNA tổng số được tách từ các bộ phận của tôm sú sử dụng kit tách RNA easy-spin™ Total RNA Extraction Kit (iNtRON, Hàn Quốc) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ và chất lượng RNA được kiểm tra bằng đo độ hấp thụ tại bước sóng 260 nm trên máy Nanodrop ND2000 (ThermoFisher Scientific, Mỹ).

**Tổng hợp cDNA từ RNA nhờ reverse transcriptase:** cDNA được tổng hợp bằng M-MLV reverse transcriptase (Enzymomics, Hàn Quốc) với các thành phần phản ứng như sau: 500 ng RNA, 2,5  $\mu$ l random hexamer

100 mM, 5  $\mu$ l dNTPs 2 mM, 5  $\mu$ l M-MLV Buffer 10X, 1  $\mu$ l enzyme M-MLV 200 units/ $\mu$ l, bổ sung ddH<sub>2</sub>O đến 50  $\mu$ l. Hỗn hợp của mỗi phản ứng được trộn đều và được đặt vào máy PCR, sử dụng chu trình nhiệt như sau: 25 °C, 10 phút để gắn mồi; 42 °C, 60 phút để tổng hợp cDNA; 95 °C, 5 phút để biến tính enzyme M-MLV. cDNA được bảo quản ở -20 °C cho tới khi sử dụng.

**Đánh giá mức độ biểu hiện gen bằng phản ứng real-time PCR (RT-qPCR),** sử dụng *EF1 $\alpha$*  làm gen nội chuẩn. Các cặp mồi (Bảng 1) được thiết kế dựa trên công cụ Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Bảng 1. Trình tự của các cặp mồi nhân bản các đoạn gen mã hoá serine proteases của tôm sú

Tên gen	Mã Genbank	Trình tự nucleotide (5'-3')	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
<i>PmPPAE1</i>	FJ595215.1	Fw: CTTCAATTTTGGTCCCAACGGT	113
		Rv: TTTGGCATCGTCGGGAGTT	
<i>PmPPAE2</i>	FJ620685.1	Fw: GGGAGGGAGCAGCTACG	119
		Rv: CTTGCCTTCGATCTCTCGTC	
<i>PmTLP1</i>	XM_037920630.1	Fw: GGATGGCATTCTGTGGTGC	141
		Rv: GCCCTCGTCAACTTCTAGGTTA	
<i>PmTLP2</i>	XM_037920635.1	Fw: CAACAGGGATGTGGATGAGG	115
		Rv: AGACAGCTTGAGCAGGGAGA	
<i>EF1-<math>\alpha</math></i>	MG775229.1	Fw: TGGGCAAGGAGAAGATCCAT	118
		Rv: TCGATCGTTCGCTTGTCGAT	

Nhân bản các gen *PmPPAE1*, *PmPPAE2*, *PmTLP1*, *PmTLP2* và gen nội chuẩn *EF1- $\alpha$*  được thực hiện bằng RT-qPCR sử dụng master mix SensiFAST™ SYBR Lo-ROX (Bioline, UK). Các thành phần phản ứng RT-qPCR được trộn đều và chu trình phản ứng được thực hiện ở 95 °C trong 2 phút để biến tính bước đầu DNA, tiếp theo là 40 chu kỳ gồm 3 bước phản ứng: i) Biến tính DNA ở 95 °C, 5 giây; ii) Gắn mồi ở 60-62 °C, 10 giây; iii) Kéo dài chuỗi ở 72 °C, 30 giây. Kết quả của RT-qPCR được phân tích bằng phần mềm Light Cycler 96. Mức độ biểu

hiện của các gen mã hóa serine protease giữa mẫu tôm nhiễm WSSV với mẫu tôm không nhiễm WSSV được đánh giá theo phương pháp của Livak và Schmittgen (2001) [16]. Các gen đích là *PmPPAE1*, *PmPPAE2*, *PmTLP1*, *PmTLP2*, chu kỳ ngưỡng (Ct) của gen quan tâm phân lập từ tôm nuôi trong bể đối chứng không nhiễm WSSV (bể PBS) được ký hiệu là Ct (C/Tg); các bể thí nghiệm tôm nhiễm WSSV được ký hiệu là Ct (T/Tg). Tương tự *EF1- $\alpha$*  là gen nội chuẩn với chu kỳ ngưỡng trong bể đối chứng và thí nghiệm tương tự như các gen đích

và được ký hiệu tương ứng Ct (C/Ref) và Ct (T/Ref).

Trong các bể thí nghiệm:  $\Delta Ct (T) = Ct (T/Tg) - Ct (T/Ref)$ .

Trong bể đối chứng:  $\Delta Ct (C) = Ct (C/Tg) - Ct (C/Ref)$ .

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct (T) - \Delta Ct (C).$$

Sau cùng, mức độ biểu hiện tương đối của gen đích trong bể thí nghiệm với bể đối chứng được tính theo công thức  $2^{-\Delta \Delta Ct}$ .

*Nuôi tôm sú và lây nhiễm WSSV trong phòng thí nghiệm:* tôm sú tại đầm nuôi được vận chuyển về phòng thí nghiệm với hệ thống sục khí để đảm bảo tôm sống khỏe mạnh. Các con tôm có kích thước và khối lượng tương đương được chia vào các bể kính có dung tích khoảng 50 lít có chứa 30 lít nước RO bổ sung muối biển với nồng độ 5-10‰, mật độ khoảng 8-10 con/bể, nhiệt độ 22-28 °C, pH 7,5. Sau khi bổ sung các thành phần giúp cân bằng hệ vi sinh, tôm được nuôi thuần trong khoảng 3 ngày với thức ăn công nghiệp rồi được chia thành 2 nhóm: nhóm đối chứng (tiêm đệm PBS) và nhóm thí nghiệm (tiêm 50 µl dịch WSSV nồng độ  $10^4$  bản sao/mL). Mẫu (2 con tôm/nghiệm thức) được thu tại các thời điểm 0 giờ và 48 giờ sau tiêm WSSV để thu các bộ phận và đánh giá sự mức độ biểu hiện, hoạt độ của các serine protease.

Hoạt độ TLP được xác định bằng phương pháp của Grenier và cộng sự [17] trên cơ sở đánh giá khả năng phân giải cơ chất BAPNA thành p-nitroaniline hấp thụ cực đại ở bước sóng 410 nm. Quy trình thí nghiệm được tiến hành như sau: 260 µl nước cất được ủ với 80 µl đệm A 5X có CaCl<sub>2</sub> 50 mM và 50 µl BAPNA 8 mM ở 37 °C trong 2 phút, sau đó bổ sung 10 µl mẫu (tổng thể tích phản ứng là 400 µl) và đo số đọc ở 410 nm mỗi 2 phút từ thời điểm 0 phút đến 10 phút. Một đơn vị hoạt độ được định nghĩa là lượng enzyme tối thiểu để tăng số đọc hấp thụ của p-nitroaniline ở 410 nm lên 0,01/phút trong thời gian phản ứng là 10 phút.

*Phương pháp xử lý thống kê số liệu:* các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2019 và GraphPad Prism version 8 với *p* value < 0,05.

### 3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

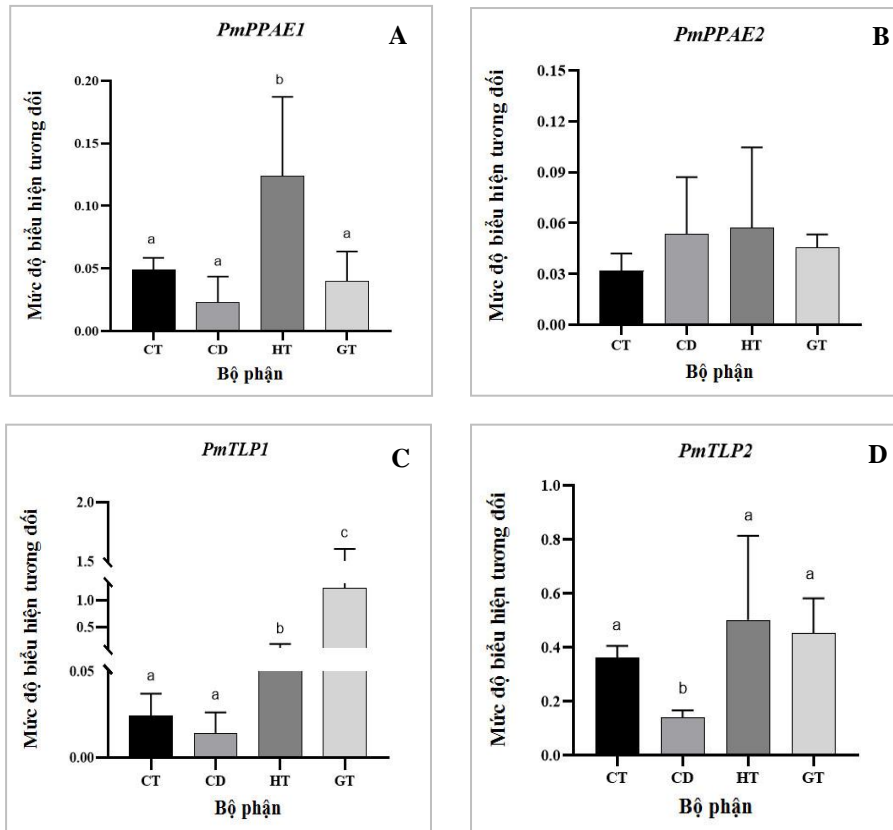
#### 3.1. Mức độ biểu hiện của các gen mã hóa serine protease trong các bộ phận khác nhau của tôm sú

Trong nghiên cứu này, mức độ biểu hiện của các gen mã hoá serine protease trong 4 bộ phận khác nhau của tôm sú là cơ thân (CT), cơ đầu (CD), huyết tương (HT) và gan tụy (GT) được đánh giá bằng RT-qPCR sử dụng gen nội chuẩn *EF1-α*. Kết quả thu được (Hình 1) cho thấy các gen *PmPPAE1*, *PmPPAE2*, *PmTLP1*, *PmTLP2* đều biểu hiện trong các bộ phận nghiên cứu. Trong đó, *PmPPAE1* biểu hiện cao nhất trong huyết tương và thấp nhất trong cơ đầu (Hình 1 A); *PmPPAE2* biểu hiện cao nhất trong huyết tương và thấp nhất trong cơ thân (Hình 1 B); *PmTLP1* biểu hiện cao nhất trong gan tụy và thấp nhất trong cơ đầu (Hình 1 C) và *PmTLP2* biểu hiện cao nhất trong huyết tương, gan tụy và thấp nhất trong cơ đầu (Hình 1D).

Charoensapsri và cộng sự [5, 6] đã xác định sự biểu hiện của hai gen *PmPPAE1* và *PmPPAE2* trong các cơ quan mang, ruột, tế bào lympho, tim, huyết tương và gan tụy bằng phương pháp RT-PCR kết hợp điện di sản phẩm RT-PCR. Kết quả cho thấy cả hai gen đều biểu hiện ở huyết tương và không thấy có ở các bộ phận còn lại. Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng phương pháp RT-qPCR với cặp mồi thiết kế nhân bản đoạn DNA kích thước lần lượt là 113 bp và 119 bp, hai gen này đều biểu hiện ở cả huyết tương và gan tụy, trong đó mức độ biểu hiện ở huyết tương là cao hơn ở gan tụy. Đối với *PmTLP1* và *PmTLP2*, chưa có nghiên cứu nào công bố về mức độ biểu hiện của hai gen trên các bộ phận của tôm sú. Bốn gen *FcTry1*, *FcTry2*, *FcTry3* và *FcTry4* mã hoá cho các TLP của tôm trắng Trung Quốc [3] đã được phát hiện thấy biểu hiện ở gan tụy và không thấy biểu hiện ở huyết tương, tim, dạ dày, mang và ruột bằng phương pháp RT-PCR kết hợp với điện di. Sự khác nhau trong độ nhạy của hai phương pháp nghiên cứu có thể là lý do dẫn đến sự sai khác của kết quả.

Trên cơ sở kết quả thu được, hai bộ phận là gan tụy và huyết tương đã được lựa chọn để đánh giá mức độ biểu hiện của các gen mã hoá

serine protease của tôm sú khi bị nhiễm virus đốm trắng WSSV trong các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Mức độ biểu hiện của các gen *PmPPAE1* (A), *PmPPAE2* (B), *PmTLP1* (C), *PmTLP2* (D) ở cơ thân (CT), cơ đầu (CĐ), huyết tương (HT) và gan tụy (GT) của tôm sú. Các dữ liệu được phân tích theo kiểm định t-test giữa từng bộ phận với nhau. Các chữ cái a, b, c biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu với  $p < 0,05$ .

### 3.2. Mức độ biểu hiện của các gen mã hoá serine protease của tôm sú nhiễm WSSV

Mức độ biểu hiện của các gen mã hoá serine protease đã được đánh giá trong huyết tương và gan tụy của tôm sú sau nhiễm WSSV. Kết quả cho thấy, mức độ biểu hiện của các gen *PmPPAE1*, *PmPPAE2* và *PmTLP2* trong huyết tương của tôm nhiễm WSSV đã tăng lần lượt là 2,32; 2,57 và 4,56 lần so với tôm đối chứng (được tiêm đệm PBS) và có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  (Hình 2 A). Trong khi đó, mức độ biểu hiện của gen *PmTLP1* giảm 1,47 lần (Hình 2A). Tương tự, mức độ biểu hiện của các

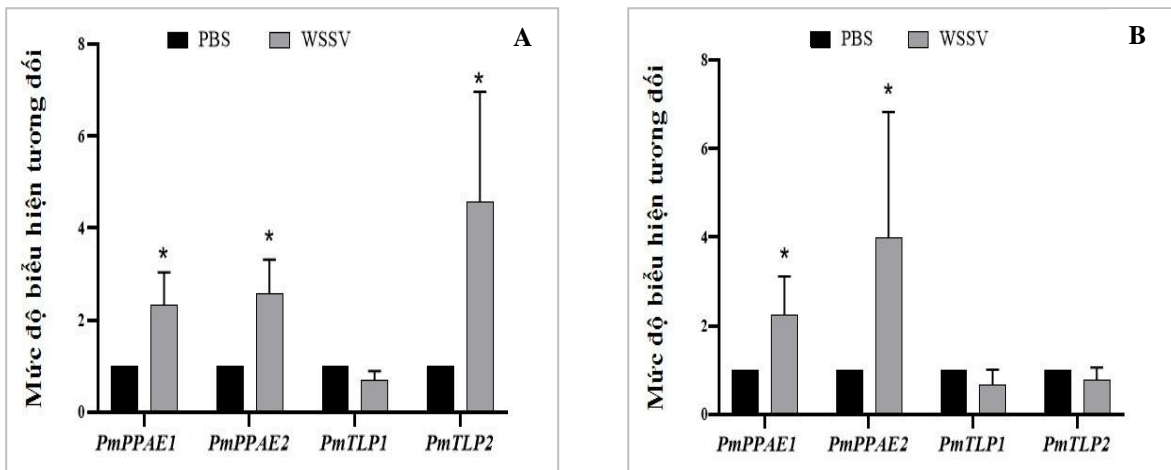
gen *PmPPAE1*, *PmPPAE2* trong gan tụy của tôm nhiễm WSSV cũng tăng lần lượt là 2,24 và 3,99 so với đối chứng ( $p < 0,05$ ) (Hình 2 B). Ngược lại, mức độ biểu hiện của gen *PmTLP1* và *PmTLP2* trong gan tụy lần lượt giảm 1,51 và 1,29 (Hình 2 B).

*PmPPAE1* trong tế bào máu (hemocyte) của tôm sú được phát hiện tăng mức độ biểu hiện 1,36 lần sau 48 giờ nhiễm vi khuẩn *Vibrio harveyi* [5]. Tương tự, *PmPPAF* thuộc họ gen mã hóa cho serine protease có vùng domain trypsin-like serine protease và chức năng tương tự *PmPPAE1* và *PmPPAE2* cũng tăng biểu hiện 2,5 lần trong huyết tương của tôm sú sau 48 giờ

nhễm WSSV [18]. Bên cạnh đó, *PmPPAE1* và *PmPPAE2* cũng đã được biết là có vai trò trong quá trình hoạt hóa proPO thành PO để hình thành melanin nội sinh chống lại tác nhân xâm nhập. Khi ức chế sự biểu hiện 2 gen trên bằng dsRNA, hoạt độ của PO trong huyết tương giảm, đồng thời tỉ lệ tôm chết do vi khuẩn *V. haveyi* tăng lên [5, 6].

*FcTry1*, *FcTry2*, *FcTry3* và *FcTry4* trong gan tụy của tôm trắng Trung Quốc được biết là có liên quan đến đáp ứng miễn dịch của tôm khi bị nhiễm WSSV. Cụ thể mức độ biểu hiện của *FcTry1*, *FcTry2* tăng, còn mức độ biểu hiện của *FcTry3*, *FcTry4* giảm tại thời điểm 24 giờ sau khi tôm nhiễm WSSV. Tuy nhiên, sự thay đổi mức độ biểu hiện của các gen này là không đáng kể khi tôm bị nhiễm vi khuẩn

*V. anguillarum* [3]. Cho đến nay, chưa có nghiên cứu nào tiên hành đánh giá mức độ biểu hiện của các gen mã hóa serine protease trong gan tụy của tôm sú. Nghiên cứu của chúng tôi đánh giá mức độ biểu hiện của gen ở mức độ mRNA dựa trên  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  của hai nhóm đối chứng và thí nghiệm, cho phép xác định chính xác sự thay đổi biểu hiện của gen. Khi tôm bị nhiễm WSSV, huyết tương là nơi xảy ra các phản ứng miễn dịch tế bào và miễn dịch dịch thể, từ đó sinh ra các phân tử chống lại tác nhân xâm nhiễm. Gen *PmPPAE1* và *PmPPAE2* có xu hướng biểu hiện tăng ở huyết tương. Kết quả đã khẳng định thêm vai trò của *PmPPAE1* và *PmPPAE2* trong đáp ứng miễn dịch của tôm sú đối với tác nhân xâm nhiễm là WSSV.



Hình 2. Mức độ biểu hiện của các gen mã hoá serine protease ở huyết tương (A) và gan tụy (B) của tôm sú nhiễm WSSV. Các dữ liệu được phân tích theo kiểm định t-test giữa nhóm tôm nhiễm WSSV so với đối chứng tiêm PBS với giá trị  $p < 0.05$  (\*).

### 3.3. Hoạt độ của TLP của tôm sú bị nhiễm WSSV

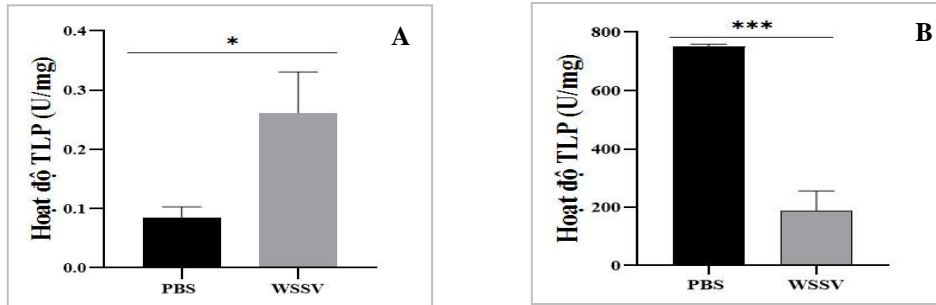
Kết quả phân tích hoạt độ TLP (Hình 3) cho thấy, hoạt độ enzyme tăng 3,25 lần và giảm 4,1 lần tương ứng trong huyết tương và gan tụy của tôm sú nhiễm WSSV so với nhóm đối chứng. Mặt khác, hoạt độ của TLP trong dịch huyết tương ở tôm thấp hơn nhiều lần trong gan tụy. Sự tăng và giảm của hoạt độ TLP tương ứng trong huyết tương và gan tụy của tôm sú phù hợp với kết quả sự tăng mức độ biểu hiện của gen mã hoá

*PmPPAE1* và *PmPPAE2* trong huyết tương và sự giảm của *PmTLP* trong gan tụy.

Hemocyanin, một protein có kim loại đồng ở động vật chân đốt, có vai trò trong hệ thống proPO, đã được tổng hợp tại vị trí tế bào F trong gan tụy rồi chuyển vào huyết tương của tôm sú [19]. Việc tạo ra các peptide có nguồn gốc từ hemocyanin được phát hiện là liên quan chặt chẽ với sự tăng biểu hiện của gen mã hoá trypsin trong gan tụy của tôm thẻ chân trắng [15]. Tương tự như hemocyanin, một giả thiết có thể đặt ra là, khi tôm bị các tác nhân ngoại

lai xâm nhập, TLP dự trữ trong gan tụy sẽ được vận chuyển đến huyết tương và tham gia vào quá trình đáp ứng miễn dịch. Đồng thời, khi tôm nhiễm virus, các hoạt động sống của tôm

cũng suy giảm, biểu hiện thông qua việc tôm giảm ăn và kém hoạt động. Do đó, các nghiên cứu tiếp theo về vai trò của TLP trong đáp ứng miễn dịch của tôm sú là cần thiết.



Hình 3. Hoạt độ của TLP ở huyết tương (A) và gan tụy (B) của tôm sú nhiễm WSSV. Các dữ liệu được phân tích theo kiểm định t-test giữa nhóm tôm nhiễm WSSV so với đối chứng tiêm PBS với giá trị  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*)

#### 4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phát hiện được mức độ biểu hiện khác nhau của các gen Clip-SP *PmPPAE1* và *PmPPAE2* và các gen mã hoá TLP *PmTLP1* và *PmTLP2* ở huyết tương và gan tụy tôm sú khi bị nhiễm WSSV. Sự biến đổi về hoạt độ TLP ở huyết tương và gan tụy tôm sú cũng phù hợp với dẫn liệu về biểu hiện gen. Các kết quả nghiên cứu này đã đưa đến nhận định về vai trò của các Clip-SP và TLP trong đáp ứng miễn dịch của tôm sú.

#### Lời cảm ơn

Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài cấp Đại học Quốc gia Hà Nội, mã số QG.20.15 và một phần kinh phí bởi đề tài Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia, mã số NAFOSTED.106.02.2018.07. Các tác giả cảm ơn GS.TS. Phan Tuấn Nghĩa đã đọc và góp ý cho bản thảo bài báo, cảm ơn ThS. Đoàn Văn Cường, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 2 đã cung cấp mẫu tôm nhiễm virus đốm trắng.

#### Tài liệu tham khảo

[1] F. Han, X. Zhang, Characterization of a Ras-related Nuclear Protein (Ran Protein) up-regulated in

Shrimp Antiviral Immunity, Fish and Shellfish Immunology, Vol. 23, 2007, pp. 937-944, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.01.022>.

[2] R. Jitvaropas, P. Amparyup, P. S. Gross, A. Tassanakajon, Functional Characterization of a Masquerade-like Serine Proteinase Homologue from the Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon*, Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, Vol. 153, No. 3, 2009, pp. 236-243, <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.03.007>.

[3] X. Z. Shi, Q. Ren, X. F. Zhao, J. X. Wang, Expression of Four Trypsin-like Serine Proteases from the Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*, as Regulated by Pathogenic Infection, Comparative Biochemistry and Physiology, Vol. 153, No. 1, 2009, pp. 2-3, <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.01.011>.

[4] O. C. Farnés, A. F. Barrios, S. G. Galván, F. V. Villasate, A Review of Digestive Enzyme Activity in Penaeid Shrimps, Crustaceana, Vol. 8, No. 3, 2007, pp. 257-275, <https://doi.org/10.1163/156854007780162424>.

[5] W. Charoensapsri, P. Amparyupa, I. Hironoc, T. Aoki, A. Tassanakajona, Gene Silencing of a ProPhenoloxidase Activating Enzyme in the Shrimp, *Penaeus monodon*, Increases Susceptibility to *Vibrio harveyi* Infection, Developmental and Comparative Immunology, Vol. 33, No. 7, 2009, pp. 815-816, <https://doi.org/doi:10.1016/j.dci.2009.01.006>.

[6] W. Charoensapsri, P. Amparyupa, I. Hironoc, T. Aoki, A. Tassanakajona, PmPPAE2, a New Class of Crustacean ProPhenoloxidase (proPO)-



- Activating Enzyme and Its Role in PO Activation, Developmental and Comparative Immunology, Vol. 35, No. 1, 2011, pp. 118-123, <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.09.002>.
- [7] M. Jearaphunt, P. Amparyup, P. Sangsuriya, W. Charoensapsri, S. Senapin, A. Tassanakajon, Shrimp Serine Proteinase Homologues PmMasSPH-1 and -2 play a Role in the Activation of the proPhenoloxidase System, Plos One, Vol. 10, No. 3, 2015, <https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.03.005>.
- [8] S. T. Jiang, M. W. Moody, H. C. Chen, Purification and Characterization of Protease from Digestive Tract of Grass Shrimp (*Penaeus monodon*), Journal of Food Science, Vol. 56, No. 2, 1991, pp. 322-326, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb05271.x>.
- [9] D. Lemos, J. M. Ezquerro, F. L. G. Carreno, Protein Digestion in Penaeid Shrimp: Digestive Proteinases, Proteinase Inhibitors and Feed Digestibility, Aquaculture, Vol. 186, No. 1+2, 2000, pp. 89-105, [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00371-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00371-3).
- [10] J. C. Sainz, F. L. G. Carreño, P. H. Cortés, *Penaeus vannamei* Isotrypsins: Purification and Characterization, Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, Vol. 138, No. 2, 2004, pp. 155-162, <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.03.002>.
- [11] T. Senphan, S. Benjakul, H. Kishimura, Purification and Characterization of Trypsin from Hepatopancreas of Pacific White Shrimp, Journal of Food Biochemistry, Vol. 39, No. 4, 2015, pp. 388-397, <https://doi.org/10.1111/jfbc.12147>.
- [12] H. L. T. Nguyen, H. T. Quach, D. Q. Trinh, H. Q. Nguyen, B. Y. Pham, T. N. Dinh, T. T. Ngo, T. N. Phan, Partial Characterization and Localization of Various Proteases from *Penaeus Monodon* Fabricius, Decapoda, Penaeidae, Crustaceana, 1978, <https://doi.org/10.1163/15685403-bja10225>.
- [13] A. M. Almazán, F. L. G. Carreño, J. A. S. Paz, G. Y. Plascencia, A. B. P. Uriarte, Effects of Dietary Protein on the Activity and mRNA Level of Trypsin in the Midgut Gland of the White Shrimp *Penaeus vannamei*, Comparative Biochemistry and Physiology, Vol. 135, No. 2, 2003, pp. 373-383, [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(03\)00091-5](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00091-5).
- [14] A. S. Paza, F. F. G. Carreña, A. M. Almazána, N. Y. H. Saavedraa, G. Y. Plascencia, Differential Expression of Trypsin mRNA in the White Shrimp (*Penaeus vannamei*) Midgut Gland Under Starvation Conditions, Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, Vol. 292, No. 1, 2003, pp. 1-17, [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(03\)00142-4](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00142-4).
- [15] C. Li, F. Wang, J. J. Aweya, D. Yao, Z. Zheng, H. Huang, S. Li, Y. Zhang, Trypsin of *Litopenaeus vannamei* is Required for the Generation of Hemocyanin-derived Peptides, Development and Comparative Immunology, Vol. 79, 2018, pp. 95-104, <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.10.015>.
- [16] K. J. Livak, T. D. Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method, Methods, Vol. 25, No. 4, 2001, pp. 402-408, <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [17] D. Grenier, Inactivation of Human Serum Bactericidal Activity by a Trypsin-like Protease Isolated from *Porphyromonas gingivalis*, Infection and Immunity, Vol. 60, No. 5, 1992, pp. 1854-1857, <https://doi.org/10.1128/0950-2688.1992.60.5.1854-1857>.
- [18] T. H. Ma, J. A. Benzie, J. G. He, C. B. Sun, S. F. Chan, PmPPAF is a pro-Phenoloxidase Activating Factor Involved in Innate Immunity Response of the Shrimp *Penaeus monodon*, Developmental and Comparative Immunology, Vol. 44, No. 1, 2014, pp. 167-168, <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.12.007>.
- [19] S. A. Lehnert, S. E. Johnson, Expression of Hemocyanin and Digestive Enzyme Messenger RNAs in the Hepatopancreas of the Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon*, Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 133, No. 2, 2002, pp. 163-171, [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00123-9](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00123-9).