

ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG, TỶ LỆ TIẾP GIỐNG VÀ TỐC ĐỘ LẮC ĐẾN SỰ SINH TRƯỞNG CỦA CHỦNG *E. coli* M15 MANG PLASMID TÁI TỔ HỢP *pQE30/PirA*

Nguyễn Văn Khanh^{1*}, Nguyễn Quang Linh^{1,5}, Nguyễn Thị Bích Phượng², Nguyễn Văn Huệ², Nguyễn Thị Thanh Xuân², Võ Phước Khánh³, Trần Quốc Dung⁴

¹ Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

² Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

³ Trường Trung học phổ thông Ông Ích Khiêm, Hòa Vang, Thành phố Đà Nẵng

⁴ Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế

⁵ Đại học Huế

TÓM TẮT

Vi khuẩn *Vibrio* được xác định là nguyên nhân gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm (AHPND). Bệnh này thường xuất hiện ở tôm sú và tôm thẻ khoảng 20 - 30 ngày sau khi thả giống, tỉ lệ chết có thể lên đến 100% ở những ao nhiễm nặng, người dân thường phải xử lý bằng cách xả bỏ ao nuôi. Bệnh AHPND là một trong những mối lo ngại lớn của ngành nuôi tôm trên toàn thế giới. Hai gene *PirA* và *PirB* của các chủng vi khuẩn *Vibrio* spp. chịu trách nhiệm chính trong gây ra bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm. Trong nghiên cứu này, sau khi chèn gene *PirA* vào vector *pQE30* và tiến hành biến nạp thành công vào tế bào *E. coli* M15. Để tiến tới biểu hiện có hiệu quả gene *PirA* trong chủng *E. coli* M15, nhiệm vụ đầu tiên là nghiên cứu tìm ra được các điều kiện nuôi cấy phù hợp cho quá trình sinh trưởng của chủng *E. coli* M15 mang plasmid tái tổ hợp *pQE30/PirA*. Chúng tôi đã tối ưu hóa điều kiện sinh trưởng của chủng *E. coli* M15 tái tổ hợp về môi trường nuôi cấy, tỷ lệ tiếp giống ban đầu, tốc độ lắc. Kết quả thu được cho thấy, chủng *E. coli* M15 tái tổ hợp sinh trưởng tốt trong môi trường LB với tỷ lệ tiếp giống ban đầu là 4%V và tốc độ lắc 250 vòng/phút.

Từ khóa: Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND), *E. coli* M15 tái tổ hợp, gene *PirA*, sinh trưởng của *E. coli* M15.

MỞ ĐẦU

Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (*Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* - AHPND) là một bệnh trên tôm do vi khuẩn *Vibrio* gây ra. Bệnh này xuất hiện ở tôm sú và tôm thẻ khoảng 20 - 30 ngày sau khi thả giống có thể dẫn đến tỷ lệ tôm chết lên đến 100% và gây những tổn thất kinh tế đáng kể cho nghề nuôi tôm, khi nhiễm bệnh tôm có dấu hiệu lơ đờ, bỏ ăn, gan tụy teo và có màu sắc nhợt nhạt, kèm theo đó là những dấu hiệu khác như mềm vỏ, sẫm màu và có đốm trên vỏ đầu ngực, phân tích mô học thì cho thấy bệnh ảnh hưởng chủ yếu ở gan tụy của tôm (Lightner *et al.*, 2012).

Bệnh AHPND lần đầu tiên được phát hiện ở Trung Quốc vào năm 2009 và lan truyền khắp Đông Nam Á, như: Thái Lan, Việt Nam, Malaysia và Philippines (Leaño, Mohan, 2012; Lightner *et al.*, 2013). Đến năm 2013, căn bệnh này đã xảy ra ở Mexico và ở châu Mỹ Latinh từ năm 2013 và năm 2015 (Han *et al.*, 2015). Ở Việt Nam năm 2010, bệnh AHPND được ghi nhận ở các tỉnh như Ninh Thuận (16 ha), Sóc Trăng (1,719 ha), Bạc Liêu (346 ha) và Cà Mau (3,493 ha) (Hien *et al.*, 2016). Sau đó, bệnh này tiếp tục xảy ra và lan rộng đến 19 tỉnh thành năm 2012, 22 tỉnh thành năm 2015, 25 tỉnh thành năm 2017 với diện tích nuôi tôm bị nhiễm bệnh lần lượt tương ứng là 28.005 ha, 9.284 ha và 6.793 ha, làm giảm đáng kể sản lượng tôm nuôi của Việt Nam (Hien *et al.*, 2016; Dang *et al.*, 2018).

Tác nhân chính gây bệnh AHPND trên tôm được xác định là do các chủng vi khuẩn *Vibrio*, như: *Vibrio parahaemolyticus* (Tran *et al.*, 2013; Nguyễn Văn Khanh *et al.*, 2019), *V. campbellii* (Han *et al.*, 2017), *V. harveyi* (Kondo *et al.*, 2015), *V. owensii* là tác nhân gây bệnh AHPND (Liu *et al.*, 2018). Các chủng vi khuẩn này đều có chứa hai gene *PirA* và *PirB* mã hoá cho protein độc tố nhị phân *PirAB*, được chứng minh là yếu tố độc lực của bệnh này (Han *et al.*, 2015). Việc sản xuất protein *PirA* và *PirB* theo con đường tái tổ hợp không chỉ là nguyên liệu kháng nguyên cho các nghiên cứu phát triển các chế phẩm phòng trị bệnh mà còn sử dụng cho mục đích chẩn đoán và các nghiên cứu khác. Vật chủ *E. coli* được sử dụng phổ biến trong tổng hợp protein tái tổ hợp do có nhiều ưu điểm như dễ nuôi cấy, sinh trưởng nhanh, các đặc điểm di truyền được nghiên cứu đầy đủ, có nhiều loại vector tạo dòng, dễ dàng thu nhận protein mục tiêu (Kaur *et al.*, 2018). Khi một hệ thống biểu hiện tối ưu thiết lập, để tăng sản lượng trong sản xuất protein tái tổ hợp có thể được tăng cường bằng cách tăng năng suất tổng

hợp protein trên mỗi tế bào trên một đơn vị thời gian (năng suất cụ thể) hoặc bằng cách tăng mật độ tế bào trên mỗi đơn vị thời gian (năng suất tế bào) (Vaz *et al.*, 2011).

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy, tỷ lệ tiếp giống ban đầu, tốc độ lắc đến sự sinh trưởng của chủng vi khuẩn *E. coli* M15 mang plasmid tái tổ hợp *pQE30/PirA* để xác định một số yếu tố thích hợp cho sự sinh trưởng của chủng *E. coli* M15 tái tổ hợp nhằm tăng năng suất tế bào trong quá trình sản xuất protein tái tổ hợp PirA.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu

- Chủng *E. coli* M15 (Qiagen, Đức) tái tổ hợp mang vector biểu hiện pQE30 (Qiagen, Đức) chứa gen *PirA* được phân lập từ chủng *Vibrio parahaemolyticus* K5 gây bệnh AHPND trên tôm thẻ chân trắng (Nguyễn Văn Khanh *et al.*, 2019).

- Một số hóa chất chủ yếu được sử dụng trong nghiên cứu: tryptone (Biobasic, Mỹ), peptone (Biobasic, Mỹ), Yeast Extract (Biobasic, Mỹ), NaCl (Merck, Đức), KCl (Merck, Đức), MgCl₂ (Merck, Đức), MgSO₄ (Merck, Đức), K₂HPO₄ (Merck, Đức); KH₂PO₄ (Merck, Đức), glycerol (Merck, Đức), Ampicillin (Biobasic, Mỹ), Kanamycin (Biobasic, Mỹ).

Bố trí thí nghiệm

Các thí nghiệm được bố trí trong các ống nghiệm loại 30 mL, trong đó chứa 05 mL môi trường được khảo sát, có bổ sung ampicillin 100 µg/mL và kanamycin 50 µg/mL, mỗi nghiệm thức lặp lại 03 lần. Giống vi khuẩn *E. coli* M15 tái tổ hợp đã được hoạt hóa sau 12 giờ nuôi trong môi trường LB, ở nhiệt độ phòng và tốc độ lắc 180 vòng/phút.

* *Thí nghiệm 01: Ảnh hưởng của các môi trường nuôi cấy đến sự sinh trưởng của tế bào E. coli tái tổ hợp*

Chúng tôi tiến hành khảo sát 04 môi trường: LB (Sambrook, Russell, 2001) SOB (Hanahan, 1983); TB (Sambrook, Russell, 2001) và YJ (Yang *et al.*, 2008). Giống vi khuẩn *E. coli* M15 tái tổ hợp được cấp vào mỗi ống nghiệm với tỷ lệ tiếp giống 10%V, được nuôi trong tủ lắc nuôi cấy vi sinh vật ở nhiệt độ phòng, tốc độ lắc 180 vòng/phút.

* *Thí nghiệm 02: Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống ban đầu đến sự sinh trưởng của tế bào E. coli tái tổ hợp*

Thí nghiệm này được tiến hành với 08 tỷ lệ thể tích tiếp giống khác nhau lần lượt là 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% và 10%. Môi trường nuôi cấy thích hợp đã khảo sát ở thí nghiệm 01. Giống vi khuẩn *E. coli* M15 tái tổ hợp được cấp vào mỗi ống nghiệm theo tỷ lệ phần trăm thể tích ở các nghiệm thức thí nghiệm, được nuôi trong tủ lắc nuôi cấy vi sinh vật ở nhiệt độ phòng, tốc độ lắc 180 vòng/phút.

* *Thí nghiệm 03: Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sự sinh trưởng của tế bào E. coli tái tổ hợp*

Chúng tôi tiến hành khảo sát với 03 tốc độ lắc khác nhau: 150, 200 và 250 vòng/phút. Môi trường nuôi cấy và tỷ lệ tiếp giống ban đầu chọn từ thí nghiệm 1 và 2. Vi khuẩn được nuôi trong tủ lắc nuôi cấy vi sinh vật ở nhiệt độ phòng.

Theo dõi, thu thập số liệu và các chỉ tiêu nghiên cứu

- *Xác định mật độ tế bào*: được thực hiện gián tiếp thông qua đo mật độ quang của dịch huyền phù nuôi vi khuẩn ở bước sóng 600nm (OD_{600nm}) trên máy quang phổ hai chùm tia U-2910 (HITACHI, Nhật Bản).

- *Xây dựng đường cong sinh trưởng*: Trong quá trình nuôi cấy, mật độ tế bào được xác định sau mỗi 2 giờ nuôi. Tiến hành xây dựng đường cong sinh trưởng bằng phần mềm Microsoft Excel 2013.

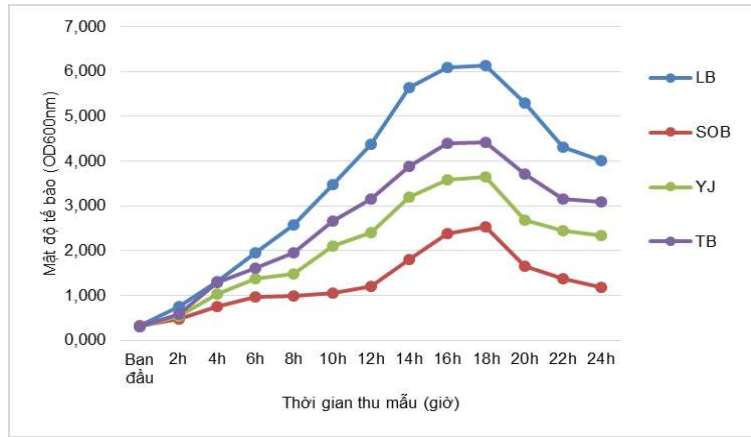
Phân tích và xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Minitab version 16.2.0 và Microsoft Excel 2013 để tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, phân tích ANOVA một yếu tố để so sánh sự sai khác của các nghiệm thức.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sự sinh trưởng của chủng *E. coli* M15 tái tổ hợp

Mỗi loại tế bào vi khuẩn khác nhau sẽ có một môi trường thích hợp nhất cho sự sinh trưởng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy chủng *E. coli* M15 tái tổ hợp mang gene mã hóa kháng nguyên PirA trên 04 môi trường khác nhau (LB, SOB, TB và YJ) trong cùng điều kiện tỷ lệ tiếp giống 10%, sinh trưởng ở nhiệt độ phòng và tốc độ lắc 180 vòng/phút. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở Hình 1 và Bảng 1.



Hình 1. Đường cong sinh trưởng của chủng *E. coli* M15 tái tổ hợp ở các môi trường khác nhau

Bảng 1. Mật độ tế bào *E. Coli* M15 tái tổ hợp ở các môi trường nuôi cấy khác nhau

Môi trường	LB	SOB	TB	YJ
Mật độ tế bào ban đầu (OD _{600nm})	0,316 ^a ± 0,050	0,320 ^a ± 0,050	0,303 ^a ± 0,029	0,303 ^a ± 0,058
Mật độ tế bào cực đại sau 18 giờ nuôi cấy (OD _{600nm})	6,133 ^a ± 0,012	2,527 ^d ± 0,006	4,423 ^b ± 0,006	3,647 ^c ± 0,015

Chú thích: Các giá trị trên cùng một hàng có các kí tự (a,b,c,...) khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

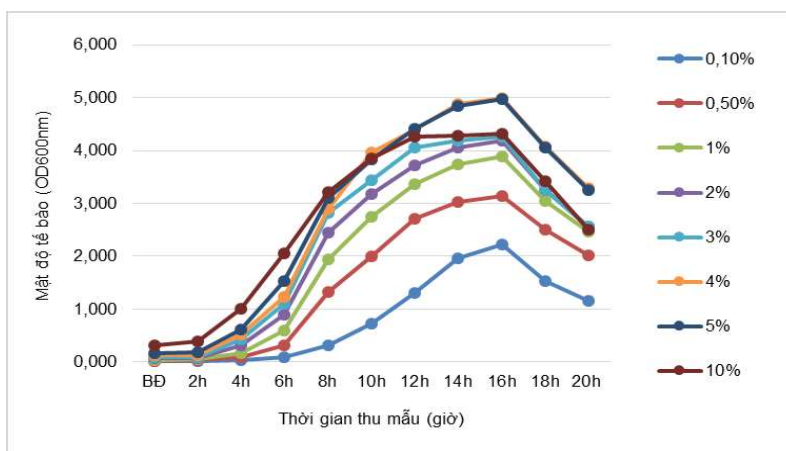
Với cùng tỷ lệ tiếp giống ban đầu 10%V (OD_{600nm} = 0,303 - 0,320), sau thời gian nuôi chúng tôi nhận thấy: trong 02 giờ nuôi cấy đầu ở các môi trường dinh dưỡng khác nhau tế bào *E. coli* M15 tái tổ hợp đang ở pha thích nghi, ở giai đoạn này mật độ tế bào ở các môi trường nuôi khác nhau không nhiều. Tuy nhiên, từ 04 giờ nuôi cấy trở đi mật độ tế bào giữa các môi trường nuôi bắt đầu thể hiện sự khác biệt, mật độ tế bào *E. coli* M15 tái tổ hợp tăng nhanh nhất ở môi trường LB, tiếp đến là môi trường TB và môi trường YJ, chậm nhất là ở môi trường SOB. Ở cả 04 môi trường nuôi cấy mật độ tế bào *E. coli* đều đạt cực đại sau 18 giờ nuôi cấy. Trong đó, môi trường LB đạt mật độ cực đại cao nhất là OD_{600nm} = 6,133, tiếp đến là môi trường TB và môi trường YJ với mật độ cực đại lần lượt là OD_{600nm} = 4,423 và OD_{600nm} = 3,647, đạt mật độ cực đại thấp nhất là ở môi trường SOB với OD_{600nm} = 2,527. Kết quả phân tích phương sai cho thấy mật độ cực đại của tế bào *E. coli* M15 tái tổ hợp giữa các môi trường LB, SOB, TB và YJ sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Trong các môi trường LB, TB và YJ chủng *E. coli* M15 tái tổ hợp đều có pha cân bằng từ 14 - 18 giờ, riêng ở môi trường SOB pha cân bằng diễn ra từ 16 - 18 giờ nuôi cấy. Sau 18 giờ nuôi cấy, ở cả 04 môi trường khảo sát tế bào *E. coli* M15 tái tổ hợp bước vào pha tụt vong.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết quả nghiên cứu của Dương Thu Hương và đồng tác giả (2016) cho thấy môi trường LB cho lượng protein IL-3 tổng hợp nhiều nhất và ổn định, mật độ tế bào thu được cao nhất (OD_{600nm} = 1,08) (Dương Thu Hương *et al.*, 2016). Theo Đinh Thị Bích Lân và đồng tác giả (2016), khi khảo sát tốc độ sinh trưởng của chủng *E. coli* BL21 tái tổ hợp mang gen mã hóa kháng nguyên 3-1E trên các môi trường khác nhau (LB, TB, SOC, SOB và YJ) cho thấy sau 11 giờ nuôi cấy, mật độ tế bào *E. coli* đạt cao nhất ở môi trường LB (OD_{600nm} = 2,952) (Đinh Thị Bích Lân *et al.*, 2016). LB là môi trường cơ bản cho sự biểu hiện protein ngoại lai, để chuẩn bị, cung cấp đầy đủ các peptide, axit amin thiết yếu, các vitamin và muối natri cho sự sinh trưởng của vi khuẩn (Dương Thu Hương *et al.*, 2016).

Như vậy, thành phần và hàm lượng các chất trong các môi trường nuôi cấy khác nhau đã ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và mật độ cực đại của chủng *E. coli* M15 tái tổ hợp mang gene mã hóa kháng nguyên PirA. Trong đó, chủng *E. coli* M15 tái tổ hợp sinh trưởng tốt nhất ở môi trường LB nên môi trường này sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống ban đầu đến sự sinh trưởng của chủng *E. coli* M15 tái tổ hợp

Ngoài yếu tố môi trường dinh dưỡng ảnh hưởng trực tiếp tới sự phát triển của vi khuẩn thì tỷ lệ tiếp giống ban đầu cũng là yếu tố cần được xác định để đảm bảo cho quá trình sinh trưởng diễn ra hiệu quả, vì mật độ vi khuẩn ảnh hưởng trực tiếp tới sự cạnh tranh trong nhu cầu dinh dưỡng, oxy. Khi mật độ tế bào trong bình nuôi cấy quá cao hoặc quá thấp đều làm cho tế bào sinh trưởng kém (Narayanaswamy, 1994). Mật độ ban đầu thấp có thể dẫn đến kéo dài pha sinh trưởng lag, trong khi đó nếu mật độ tế bào ban đầu cao hơn có thể nhanh chóng dẫn đến pha tụt vong (Ling *et al.*, 2008). Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống ban đầu tới sự sinh trưởng và phát triển của chủng *E. coli* M15 tái tổ hợp được thể hiện ở Hình 2 và Bảng 2.



Hình 2. Đường cong sinh trưởng của chủng *E. coli* M15 tái tổ hợp ở các tỷ lệ tiếp giống ban đầu khác nhau

Bảng 2. Mật độ tế bào *E. coli* M15 tái tổ hợp ở các tỷ lệ tiếp giống khác nhau

Tỷ lệ tiếp giống (%V)	Mật độ tế bào ban đầu (OD _{600nm})	Mật độ tế bào cực đại sau 16 giờ nuôi cấy (OD _{600nm})
0,1	0,0032 ^e ± 0,0005	2,2267 ^e ± 0,0153
0,5	0,0158 ^e ± 0,0025	3,1400 ^d ± 0,0361
1	0,0317 ^e ± 0,0050	3,8967 ^c ± 0,0586
2	0,0633 ^{de} ± 0,0100	4,1800 ^b ± 0,0300
3	0,0950 ^{cd} ± 0,0151	4,2600 ^b ± 0,0557
4	0,1267 ^{bc} ± 0,0201	4,9900 ^a ± 0,0624
5	0,1583 ^b ± 0,0252	4,9667 ^a ± 0,0777
10	0,3200 ^a ± 0,0500	4,3167 ^b ± 0,0252

Chú thích: Các giá trị trên cùng một cột có các kí tự (a,b,c,...) khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, ở các nghiệm thức thí nghiệm chủng *E. coli* M15 tái tổ hợp đạt mật độ cực đại sau 16 giờ nuôi cấy. Mật độ cực đại tại pha cân bằng của tế bào *E. coli* M15 tái tổ hợp nuôi ở tỷ lệ tiếp giống ban đầu 4% đạt cao nhất (OD_{600nm} = 4,99) sai khác có ý nghĩa so với các nghiệm thức có tỷ lệ tiếp giống ban đầu 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 10% ($p < 0,05$), nhưng không sai khác có ý nghĩa thống kê với nghiệm thức có tỷ lệ tiếp giống ban đầu 5% (OD_{600nm} = 4,9667) ($p > 0,05$). Mật độ cực đại của tế bào *E. coli* M15 tái tổ hợp ở các nghiệm thức có tỷ lệ tiếp giống ban đầu 2% (OD_{600nm} = 4,18), 3% (OD_{600nm} = 4,26) và 10% (OD_{600nm} = 4,3167) không có sự sai khác về mặt thống kê ($p > 0,05$). Mật độ cực đại của tế bào *E. coli* M15 tái tổ hợp ở các nghiệm thức 0,1% (OD_{600nm} = 2,2267), 0,5% (OD_{600nm} = 3,14) và 1% (OD_{600nm} = 3,8967) sai khác có ý nghĩa thống kê với nhau cũng như với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$).

Ở các lô mật độ tế bào *E. coli* M15 tái tổ hợp ban đầu càng cao, số lượng tế bào có cơ hội phát triển qua pha log nhiều hơn so với các lô mật độ thấp, số lượng tế bào càng tăng nhanh hơn vì thế đạt mật độ cực đại lớn hơn. Nhưng ở mật độ tế bào *E. coli* M15 tái tổ hợp càng cao, sự cạnh tranh về chất dinh dưỡng, oxy của các tế bào vi khuẩn càng nhiều làm hạn chế quá trình hô hấp, trao đổi chất, dẫn đến tốc độ tăng trưởng và mật độ cực đại của vi khuẩn ở các lô có mật độ ban đầu cao sẽ thấp hơn so với các lô có mật độ thấp.

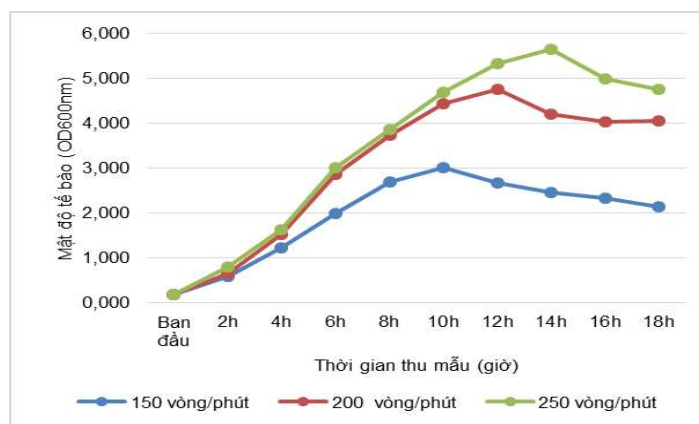
Như vậy, trong cùng môi trường LB các tỷ lệ tiếp giống khác nhau đã có ảnh hưởng khác nhau đến khả năng sinh trưởng của chủng *E. coli* M15 tái tổ hợp. Với mục đích thu được lượng sinh khối tế bào nhiều nhất trong một mẻ nuôi thì tỷ lệ tiếp giống ban đầu 4% cho hiệu quả tốt nhất.

Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sự sinh trưởng của chủng *E. coli* M15 tái tổ hợp

Tốc độ lắc ảnh hưởng nhiều đến sinh trưởng tế bào do ảnh hưởng đến quá trình cung cấp oxy và chất dinh dưỡng. Hàm lượng oxy trong môi trường nuôi cấy đóng vai trò quan trọng trong quá trình trao đổi chất của tế bào vi khuẩn. Môi trường lỏng được trộn đều sẽ tăng tốc độ hòa tan của oxy, đồng thời tạo điều kiện dễ dàng cho tế bào hấp thụ chất dinh dưỡng. Tốc độ sinh trưởng của tế bào sẽ tăng khi tốc độ lắc tăng trong một phạm vi thích

hợp. Tuy nhiên, khi tốc độ lắc quá cao sẽ dẫn đến sự ức chế sinh trưởng của tế bào vi khuẩn do tế bào bị biến dạng gây nên hiện tượng tự phân làm chết tế bào (Narayanaswamy, 1994; Ziv, 2000).

Trong nghiên cứu này, chủng *E. coli* M15 tái tổ hợp được nuôi cấy trong môi trường LB và tỷ lệ tiếp giống ban đầu 4%V được khảo sát ở các mức tốc độ lắc 150, 200 và 250 vòng/phút. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở Hình 3 và Bảng 3.



Hình 3. Đường cong sinh trưởng của chủng *E. coli* M15 tái tổ hợp ở các tốc độ lắc khác nhau

Bảng 3. Một số chỉ tiêu về sinh trưởng của chủng *E. coli* M15 tái tổ hợp ở các tốc độ lắc khác nhau

Tốc độ lắc	150 vòng/phút	200 vòng/phút	250 vòng/phút
Mật độ tế bào ban đầu (OD _{600nm})	0,1878 ^a ± 0,0148	0,1767 ^a ± 0,0100	0,1900 ^a ± 0,0087
Mật độ tế bào cực đại (OD _{600nm})	3,0189 ^c ± 0,1104	4,7578 ^b ± 0,0578	5,6500 ^a ± 0,1624
Thời gian <i>E. coli</i> đạt mật độ cực đại (giờ)	10	12	14

Chú thích: Các giá trị trên cùng một hàng có các kí tự (a,b,c,...) khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Từ dữ liệu thí nghiệm ở Hình 3 và Bảng 3 cho thấy có sự khác nhau về thời gian để chủng *E. coli* M15 tái tổ hợp đạt cực đại ở các tốc độ lắc khác nhau, cụ thể: Ở các lô thí nghiệm với tốc độ lắc 150 vòng/phút (10 giờ sau khi nuôi cấy), 200 vòng/phút (12 giờ sau khi nuôi cấy) và 250 vòng/phút (14 giờ sau khi nuôi cấy). Mật độ cực đại tế bào vi khuẩn lớn nhất là ở nghiệm thức với tốc độ lắc 250 vòng/phút (OD_{600nm} = 5,65), tiếp đến là nghiệm thức với tốc độ lắc 150 vòng/phút (OD_{600nm} = 4,7578) và đạt thấp nhất ở nghiệm thức với tốc độ lắc 100 vòng/phút (OD_{600nm} = 3,0189). Kết quả phân tích phương sai cho thấy mức độ cực đại của *E. coli* M15 tái tổ hợp ở các nghiệm thức sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Nhìn chung, khả năng sinh trưởng của chủng *E. coli* M15 mang plasmid tái tổ hợp *pQE30/PirA* chịu ảnh hưởng đáng kể bởi đổi tốc độ lắc. Tốc độ lắc 250 vòng/phút cho khả năng sinh trưởng của chủng *E. coli* M15 tái tổ hợp tốt nhất.

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng của chủng *E. coli* M15 mang plasmid tái tổ hợp *pQE30/PirA* cho thấy chủng *E. coli* M15 tái tổ hợp sinh trưởng tốt nhất trong môi trường LB với mật độ tế bào cực đại đạt OD_{600nm} = 6,133 sau 18 giờ nuôi cấy; tỷ lệ thể tích tiếp giống ban đầu là 4%V cho hiệu quả nuôi cấy cao nhất với mật độ tế bào đạt cực đại sau 16 giờ nuôi cấy (OD_{600nm} = 4,99) và tốc độ lắc 250 vòng/phút cho hiệu quả cao nhất sau 14 giờ nuôi cấy mật độ tế bào đạt cực đại là OD_{600nm} = 5,65.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ từ Bộ Giáo dục và Đào tạo qua đề tài khoa học và công nghệ cấp Bộ (mã số CT2018-DHH-04).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Đinh Thị Bích Lân, Phùng Thăng Long, Huỳnh Văn Chương, Đặng Thanh Long, Hoàng Tấn Quảng, Lê Đức Thọ, Lê Quốc Việt, Lê Công Thịnh, Đặng Thị Hương, Hoàng Thị Thùy Nhung (2016). Cải thiện mức độ biểu hiện kháng nguyên tái tổ hợp 3-1E của *Eimeria* trong *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y* 28(2): 55-63.

- Dang TL, Pham AT, Phan TV (2018). Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Vietnam. *J Asian Fish Soc* 31S: 274-282.
- Han J, Tang K, Aranguren L, Piamsomboon P (2017). Characterization and pathogenicity of acute hepatopancreatic necrosis disease natural mutants, pirABvp (-) *V. parahaemolyticus*, and pirABvp (+) *V. campbellii* strains. *Aquaculture* 470: 84-90.
- Han JE, Tang KF, Lightner DV (2015). Genotyping of virulence plasmid from *Vibrio parahaemolyticus* isolates causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *Dis Aqua Organ* 115(3): 245-251.
- Han JE, Tang KF, Tran LH, Lightner DV (2015). Photorhabdus insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis Aqua Organ* 113(1): 33-40.
- Hanahan D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166(4): 557-580.
- Hien NT, Huong NTL, Chuong VD, Nga NTV, Quang PH, Hang BT, Long NV (2016). Status of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and other emerging diseases of penaeid shrimps in Viet Nam. Addressing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) and Other Transboundary Diseases for Improved Aquatic Animal Health in Southeast Asia: Proceedings of the ASEAN Regional Technical Consultation on EMS/AHPND and Other Transboundary Diseases for Improved Aquatic Animal Health in Southeast Asia, 22-24 February 2016, Makati City, Philippines, *Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center*.
- Dương Thu Hương, Nguyễn Thị Quý, Đặng Thị Ngọc Hà, Lê Thị Thu Hồng, Trương Nam Hải (2016). Nghiên cứu tối ưu điều kiện biểu hiện interleukin-3 người dung hợp với pEiB trong *E. coli*. *Tạp chí Sinh học* 38(2): 250-256.
- Kaur J, Kumar A, Kaur J (2018). Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *Int J Biol Macromol* 106: 803-822.
- Nguyễn Văn Khanh, Nguyễn Quang Linh, Trần Thúy Lan, Trần Quang Khánh Vân, Nguyễn Thị Kim Cơ, Trần Quốc Dung (2019). Phân lập và sàng lọc các chủng *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm thẻ chân trắng nuôi tại Phong Điền, Thừa Thiên Huế bằng chỉ thị phân tử 16s rRNA. *Hue University Journal of Science: Natural Science* 128(1E): 47-58.
- Kondo H, Van PT, Dang LT, Hirono I (2015). Draft genome sequence of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13. 17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genom Ann* 3(5): e00978-00915.
- Leaño EM, Mohan C (2012). Early mortality syndrome threatens Asia's shrimp farms. *Global Aqua Advoc* 2012(7/8): 38-39.
- Lightner D, Redman C, Pantoja B, Noble L, Nunan LT, Tran L (2013). Documentation of an Emerging Disease (early mortality syndrome) in SE Asia & Mexico. *OIE Reference Laboratory for Shrimp Diseases, Department of Veterinary Science & Microbiology, School of Animal and Comparative Biomedical Sciences*.
- Lightner DV, Redman R, Pantoja C, Noble B, Tran L (2012). Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aqua Advoc* 15(1): 40.
- Ling OS, Kiong ALP, Hussein S (2008). Establishment and optimisation of growth parameters for cell suspension cultures of *Ficus deltoidea*. *Ame Eur J SustainAgri* 2(1): 38-49.
- Liu L, Xiao J, Zhang M, Zhu W, Xia X, Dai X, Pan Y, Yan S, Wang Y (2018). A *Vibrio owensii* strain as the causative agent of AHPND in cultured shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J Invert Pathol* 153: 156-164.
- Narayanaswamy S (1994). Plant cell and tissue culture, *Tata McGraw-Hill Education*.
- Sambrook J, Russell DW (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Tran L, Nunan L, Redman RM, Mohney LL, Pantoja CR, Fitzsimmons K, Lightner DV (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis Aqua Organ* 105(1): 45-55.
- Vaz MRF, França RLSd, Andrade SSLd, Sousa Junior FCd, Santos ESd, Martins DRA, Macedo GRd (2011). Influence of culture medium on the production of eif antigen from *Leishmania chagasi* in recombinant *Escherichia coli*. *Braz J Microbiol* 42(4): 1390-1396.
- Yang J, Yang C, Jiang H, Qiao C (2008). Overexpression of methyl parathion hydrolase and its application in detoxification of organophosphates. *Biodegra* 19(6): 831-839.
- Ziv M (2000). Bioreactor technology for plant micropropagation. *Horticult Rev* 24: 1-30.

EFFECTS OF NUTRIENT MEDIA, INITIAL SEEDING RATE AND SHAKING SPEED ON THE GROWTH OF *E. coli* M15 STRAIN BRINGING PQE30/PIRA RECOMBINANT PLASMID

Nguyen Van Khanh^{1*}, Nguyen Quang Linh^{1,5}, Nguyen Thi Bich Phuong², Nguyen Van Hue²,
Nguyen Thi Thanh Xuan², Vo Phuoc Khanh³, Tran Quoc Dung⁴

¹ Institute of Biotechnology, Hue University

² University of Agriculture and Forestry, Hue University

³ Ong Ich Khiem High School - Hoa Vang, Danang city

⁴ University of Education, Hue University

⁵ Hue University

SUMMARY

Vibrio has been defined as a cause of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND). This disease often occur in *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus monodon* about 20 - 30 days after stocking, the mortality is able to be up 100% in the severe infected ponds, people have to handle by discharging ponds. AHPND is one of the major concerns of shrimp farming worldwide. The both *PirA* and *PirB* genes of *Vibrio* spp. strains are mainly responsible for causing AHPND in shrimp. In this study, after inserting *PirA* gene into *pQE30* vector and successfully transformed *pQE30/PirA* recombinant plasmid into *E. coli* M15 cells. In order to reach an effective expression of *PirA* gene in *E. coli* M15 cells, first task is to find out suitable culture conditions for the growth of *E. coli* M15 strain bringing *pQE30/PirA* recombinant plasmid. We optimized culture conditions of the *E. coli* M15 strain including nutrient media, initial seeding rate and shaking speed. The results showed that the *E. coli* M15 strain grew well in LB medium with initial seeding rate of 4%V and shaking speed of 250 rpm.

Keywords: Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND), *E. coli* M15 recombinant strain, *PirA* gene, growth of *E. coli* M15.

* Author for correspondence: Tel: +84-396922302; Email: nvkhanh@hueuni.edu.vn