

TỐI ƯU ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY BIỂU HIỆN PROTEIN KHÁNG NGUYÊN P102 TÁI TỔ HỢP CỦA *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* TRONG *E. COLI* BL21 (DE3)

Phùng Thăng Long

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

Tác giả liên hệ: thanglong@huaf.edu.vn

Nhận bài: 26/09/2021 Hoàn thành phản biện: 21/10/2021 Chấp nhận bài: 29/10/2021

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là tối ưu điều kiện nuôi cấy bao gồm: nhiệt độ cảm ứng, môi trường nuôi cấy, nồng độ Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), thời điểm cảm ứng và thời gian nuôi cấy sau cảm ứng IPTG để biểu hiện tốt hơn protein kháng nguyên P102 tái tổ hợp của *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh), tác nhân chính gây bệnh suyễn lợn trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3). Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng protein kháng nguyên P102 tái tổ hợp của Mh biểu hiện mạnh nhất ở nhiệt độ cảm ứng 30°C, trên môi trường YJ, với nồng độ 0,6 mM IPTG, mật độ quang (OD₆₀₀) đạt 0,8 và thời gian nuôi cấy sau cảm ứng là 6 giờ.

Từ khóa: *Mycoplasma hyopneumoniae*, P102, Biểu hiện protein, Protein tái tổ hợp

OPTIMIZING CULTURE PARAMETERS FOR EXPRESSION OF RECOMBINANT P102 ANTIGEN PROTEIN FROM *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* IN *E. COLI* BL21 (DE3)

Phung Thang Long

University of Agriculture and Forestry, Hue University

ABSTRACT

The objective of this study was to optimize culture parameters including induction temperature, culture media, Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) inducer concentration, induction time and post-induction IPTG incubation time for better expression of recombinant P102 antigen protein from *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh), a causative agent of porcine enzootic pneumonia, in *E. coli* BL21 (DE3). The results showed that the induction temperature at 30°C, YJ medium, IPTG concentration of 0.6 mM, induction time at optical density (OD₆₀₀) of 0.8 and post-induction incubation time for 6 h were optimal for the expression of target protein of P102 in *E. coli* BL21 (DE3).

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*, P102, Protein expression, Recombinant protein

1. MỞ ĐẦU

Bệnh suyễn lợn do *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh) gây ra là một bệnh truyền nhiễm mãn tính, ảnh hưởng đến lợn ở tất cả các độ tuổi và trên phạm vi toàn thế giới (Austen và cs., 2006). Khi bị bệnh, lợn còi cọc, chậm lớn, hiệu quả chuyển hóa thức ăn thấp và gây thiệt hại nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi lợn (Thacker và cs., 1998; Đặng Xuân Bình và Đặng Thị Mai Lan, 2011). Khi nghiên cứu về hệ gene của Mh,

các báo cáo cho biết hệ gene của Mh mã hóa cho nhiều protein mang tính kháng nguyên, có khả năng kích thích hệ miễn dịch tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ gia súc (Seymour và cs., 2010; Bogema và cs., 2011). Protein P102 là một trong số các protein của Mh, đã được chứng minh có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch chống Mh và có thể sử dụng để chế tạo vắc xin thế hệ mới phòng bệnh suyễn lợn (Simionatto và cs., 2012; Galli và cs., 2013).

Ở Việt Nam bệnh suyễn lợn được phát hiện đầu tiên vào năm 1953 ở một số trang trại giống lợn ở miền Bắc, đến năm 1962 bệnh đã lan ra khắp các tỉnh thành và đến nay bệnh vẫn còn lưu hành và có tỷ lệ nhiễm cao. Kết quả nghiên cứu gần đây ở các tỉnh Cao Bằng, Hà Tây và Thái Nguyên trên 92 đàn lợn với 862 cá thể lợn nái sinh sản đã phát hiện có 42,3% đàn lợn và 15% cá thể mắc bệnh suyễn (Đặng Xuân Bình và Đặng Thị Mai Lan, 2011). Hiện nay, để phòng bệnh suyễn lợn người chăn nuôi thường sử dụng kháng sinh. Thói quen này dẫn đến tình trạng vi khuẩn kháng thuốc, và gây tồn dư kháng sinh trong thực phẩm (Trần Thị Dân và cs., 2003; Huỳnh Văn Chương và cs., 2011). Để đảm bảo an toàn thực phẩm cho người tiêu dùng, và bảo vệ sức khỏe cho đàn lợn, xu hướng nghiên cứu sản xuất vắc xin thế hệ mới, và các chế phẩm sinh học phòng, trị bệnh suyễn lợn đang được quan tâm. Trong một nghiên cứu gần đây, chúng tôi đã tạo dòng và biểu hiện thành công đoạn gene mã hóa protein kháng nguyên P102 của *Mh* có khối lượng phân tử 38 kDa bao gồm đuôi dung hợp của vector pET200/D-TOPO (Phùng Thăng Long và cs., 2021). Để đạt được mức độ biểu hiện protein cao, các dòng tế bào mang vector tái tổ hợp pET200/D-TOPO/P102 cần phải được nuôi cấy ở các điều kiện tối ưu. Mục tiêu của nghiên cứu này là tối ưu điều kiện nuôi cấy bao gồm nhiệt độ cảm ứng, môi trường nuôi cấy, nồng độ chất cảm ứng IPTG, thời điểm cảm ứng và thời gian nuôi cấy sau cảm ứng để biểu hiện tốt hơn protein kháng nguyên P102 tái tổ hợp trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3) tạo nguồn nguyên liệu khởi đầu sản xuất vắc xin thế hệ mới, chế phẩm sinh học phòng, trị bệnh suyễn lợn trong thời gian tới.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- Chủng *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp mang gene mã hóa protein kháng nguyên P102 của *Mh* (pET200/D-TOPO/P102) (Phùng Thăng Long và cs., 2021).

- Các môi trường nuôi cấy: LB (Loc và cs., 2013), YJ (Loc và cs., 2011), TB (Shen và cs., 2007), HSG (Miksch và cs., 2008) và M9ZB cải tiến (Lee và cs., 2000).

- Chất cảm ứng Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Bio-Rad).

- Kit ProBond™ Purification System (Thermo Fisher Scientific, USA) để tinh sạch protein.

- Các trang thiết bị, vật liệu thiết yếu khác cho biểu hiện, tinh sạch protein và điện di trên gel 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Trong nghiên cứu này, các điều kiện nuôi cấy chính gồm nhiệt độ cảm ứng, môi trường nuôi cấy, nồng độ chất cảm ứng IPTG, thời điểm cảm ứng và thời gian nuôi cấy sau cảm ứng được tối ưu theo các phương pháp được mô tả trong báo cáo của Phùng Thăng Long và cs. (2019).

2.2.1. Tóm tắt phương pháp tối ưu nhiệt độ cảm ứng

Vi khuẩn *E. coli* mang vector tái tổ hợp pET200/D-TOPO/P102 được nuôi cấy trong các bình tam giác loại 50 ml chứa 20 ml môi trường LB (pH 7) có bổ sung 100 μ g/ml Kanamycin, ở 37°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút và tỷ lệ tiếp giống là 2%. Khi mật độ quang đo ở bước sóng 600 nm (OD_{600}) đạt tới 0,8 thì bổ sung 0,8 mM IPTG vào các bình, và ủ chúng ở các nhiệt độ khác nhau: 16, 20, 25, 30 và 37°C, một bình không bổ sung IPTG và ủ ở nhiệt độ 30°C, các bình được lắc với tốc độ 150 vòng/phút trong 8 giờ. Sinh khối được thu bằng phương pháp ly tâm ở tốc độ 10000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút và tách chiết protein tổng số bằng phương pháp huyền phù tế bào trong đệm

TNE (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA) bao gồm 1 % Triton X-100, 0,008 mg/ml lysozyme, ủ trong đá 60 phút, sau đó xử lý với sóng siêu âm trong 5 phút. Vì protein P102 tái tổ hợp biểu hiện ở dạng thể vùi (Phùng Thăng Long và cs., 2021), môi trường được ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút, ở 4°C trong 10 phút để thu kết tủa, và hòa tan protein bằng dung dịch Urea 8M (8 M urea, 0,01 M Tris, 0,1 M NaH₂PO₄, pH 8,0), lắc với tốc độ 150 vòng/phút, nhiệt độ 30°C trong 2 giờ, sau đó ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút để thu protein thể vùi. Protein P102 (dung hợp) được tinh sạch bằng Kit ProBond™ Purification System (Thermo Fisher Scientific, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mức độ biểu hiện protein P102 được phân tích bằng điện di trên gel 15% SDS-PAGE với điện thế 60 V, cường độ 21mA và thời gian 2 giờ. Sau đó, gel được nhuộm với Coomassie Blue R250 và hình ảnh được phân tích bằng phần mềm Quality One (ver 4.1, BioRad) để lựa chọn nhiệt độ tối ưu cho biểu hiện protein P102.

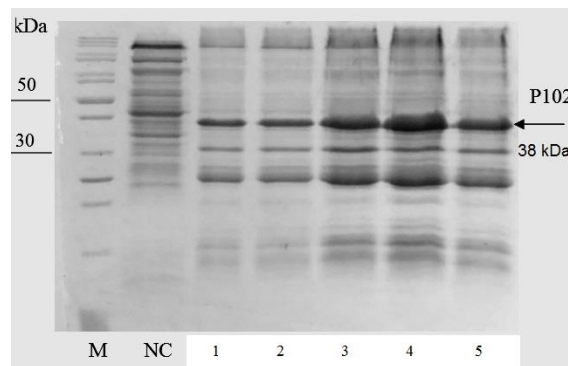
2.2.2. Tóm tắt phương pháp tối ưu môi trường nuôi cấy, nồng độ IPTG, thời điểm cảm ứng, thời gian nuôi cấy sau cảm ứng

Các môi trường nuôi cấy biểu hiện protein P102 tái tổ hợp gồm LB, TB, YJ, M9ZB và HSG, chất cảm ứng IPTG với các nồng độ 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 và 1,0 mM, thời điểm cảm ứng khi OD₆₀₀ môi trường đạt 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 và 1,5, thời gian nuôi cấy sau cảm ứng trong 2, 4, 6 và 8 giờ lần lượt được nghiên cứu tối ưu theo các phương pháp đã được mô tả trong báo cáo trước đây của chúng tôi (Phùng Thăng Long và cs., 2019), và trong tóm tắt phương pháp tối ưu nhiệt độ cảm ứng (Mục 2.2.1). Các thông số nuôi cấy đã được tối ưu trong nghiên cứu trước sẽ được ứng dụng trong các nghiên cứu sau.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tối ưu nhiệt độ cảm ứng biểu hiện protein kháng nguyên P102 tái tổ hợp

Kết quả điện di đánh giá mức độ biểu hiện protein kháng nguyên P102 tái tổ hợp ở 5 mức nhiệt độ cảm ứng khác nhau: 16, 20, 25, 30 và 37°C được trình bày trên Hình 1.



Hình 1. Biểu hiện protein kháng nguyên P102 tái tổ hợp trong môi trường LB ở các mức nhiệt độ cảm ứng khác nhau. M: Marker protein (10 - 200 kDa Bio-Basic); NC: Tế bào *E. coli* tái tổ hợp không được cảm ứng bằng IPTG; 1-5: Biểu hiện protein P102 được cảm ứng bằng 0,8 mM IPTG khi OD₆₀₀ của môi trường đạt 0,8, ở các mức nhiệt độ cảm ứng tương ứng 16, 20, 25, 30 và 37°C trong 8 giờ

Hình 1 cho thấy protein P102 tái tổ hợp biểu hiện ở tất cả các mức nhiệt độ cảm ứng nghiên cứu. Kết quả cũng chỉ ra rằng mức độ biểu hiện protein P102 tái tổ hợp tăng dần với sự nâng cao nhiệt độ cảm ứng từ 16 lên 20, 25°C (lần 1, 2, 3) và đạt được mức biểu hiện cao nhất ở nhiệt độ 30°C (lần 4). Tuy nhiên,

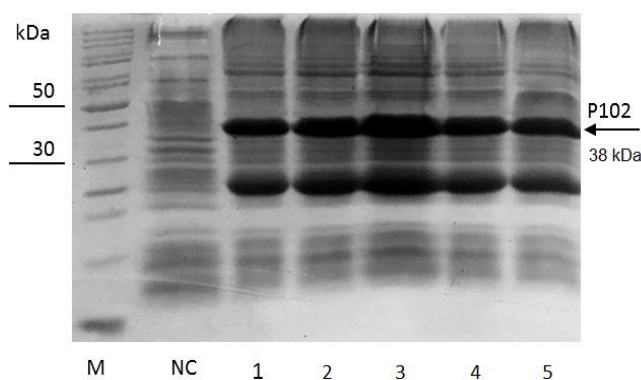
biểu hiện protein P102 giảm ở mức nhiệt độ cảm ứng cao hơn, 37°C (lần 5). Các kết quả hiện tại phù hợp với các báo cáo trước đây cho rằng ở trong giới hạn nhiệt độ bình thường, tốc độ kéo dài chuỗi peptide tăng lên theo sự nâng cao của nhiệt độ, dẫn đến sự tổng hợp protein cao hơn (Farewell và

Neithdhardt, 1998); việc giảm lượng protein biểu hiện ở nhiệt độ cao 37°C có thể do sự tự phân hủy của tế bào vi khuẩn sau cảm ứng (Pathak và cs., 2008). Với mức biểu hiện protein P102 cao nhất ở nhiệt độ cảm ứng 30°C, nhiệt độ này được xem là nhiệt độ cảm ứng tối ưu và được lựa chọn đưa vào sử dụng trong nghiên cứu tối ưu các thông số nuôi cấy tiếp theo để biểu hiện protein P102 trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3). Kết quả này cũng tái khẳng định protein P102 tái tổ hợp của *Mh* biểu hiện ở dạng thể vùi (Phùng Thăng Long và cs., 2021). Quan sát ở tế bào *E. coli* tái tổ hợp không được bổ sung chất cảm ứng IPTG (NC, Hình 1), thấy không có sự biểu hiện protein điều đó có nghĩa việc bổ sung chất cảm ứng IPTG là cần thiết để biểu hiện protein P102 tái tổ hợp. Mặt khác, protein P102 tái tổ hợp biểu hiện ở dạng thể vùi ở tất cả các mức nhiệt độ thấp hơn 37°C (30, 25, 20 và 16°C) chứng tỏ nhiệt độ cảm ứng thấp không làm ảnh hưởng đến biểu hiện protein P102 ở dạng thể vùi. Kết quả này của chúng tôi trái ngược với báo cáo trước đây cho rằng: có thể khống chế biểu hiện protein thể vùi bằng cách biểu hiện protein ở nhiệt độ cảm ứng thấp hơn để giảm tốc độ phiên dịch mã protein (Schein và cs., 1988). Nguyên nhân

sự khác biệt trên được cho có thể do sự biến đổi trong gấp khúc protein vì sự khác biệt giữa các protein về kích thước, tính kỵ nước, sự sửa đổi sau khi dịch mã, điểm đẳng điện (Donovan và cs., 1996).

3.2. Tối ưu môi trường nuôi cấy biểu hiện protein kháng nguyên P102 tái tổ hợp

Tối ưu môi trường nuôi cấy cho biểu hiện protein kháng nguyên P102 đã được thực hiện với 5 loại môi trường khác nhau gồm LB, YJ, TB, HSG và M9ZB cải tiến. Việc nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp (pET200/D-TOPO/P102) được thực hiện theo các bước và các thông số nuôi cấy như thí nghiệm tối ưu nhiệt độ, tuy nhiên sử dụng nhiệt độ cảm ứng thích hợp là 30°C. Kết quả điện di protein trên gel 15% SDS-PAGE (Hình 2) cho thấy ở tế bào *E. coli* tái tổ hợp không được bổ sung chất cảm ứng IPTG (NC) không có sự biểu hiện protein P102. Môi trường YJ (lần 3) cho kết quả biểu hiện protein kháng nguyên P102 tái tổ hợp tốt nhất. Ở các môi trường khác như LB (lần 1), môi trường M9ZB cải tiến (lần 2), HSG (lần 4), và TB (lần 5) mức độ biểu hiện protein P102 là tương đương nhau.



Hình 2. Biểu hiện protein kháng nguyên P102 tái tổ hợp trong các môi trường nuôi cấy khác nhau. M: Marker protein (10 - 200 kDa Bio-Basic); NC: Tế bào *E. coli* tái tổ hợp không được cảm ứng bằng IPTG; 1-5: Biểu hiện protein P102 tái tổ hợp lần lượt trên các môi trường LB, M9ZB, YJ, HSG và TB được cảm ứng 0,8 mM IPTG khi OD₆₀₀ đạt 0,8, thời gian nuôi cấy sau cảm ứng 8 giờ

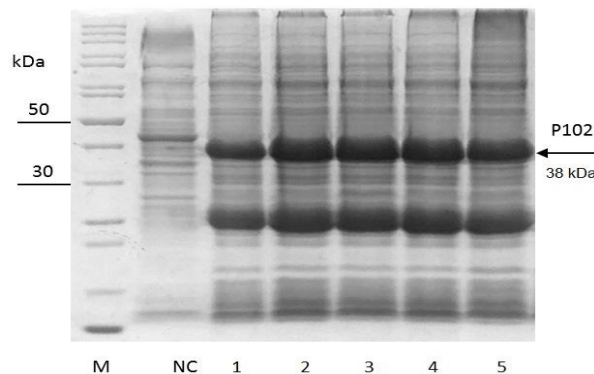
Trên thực tế, LB là một trong các môi trường thường được sử dụng để nuôi cấy và

biểu hiện protein tái tổ hợp trong *E. coli* (Miksch và cs., 2008). Tuy nhiên, trong

nguyên cứu này kết quả cho thấy môi trường YJ phù hợp hơn cho biểu hiện protein P102 tái tổ hợp trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3). Về nguyên lý các môi trường nuôi cấy nói chung cung cấp axit amin, vitamin, khoáng và các nguyên tố vi lượng cho sự sinh trưởng của vi khuẩn và biểu hiện protein trong *E. coli*. Việc sử dụng các môi trường nuôi cấy có thành phần khác nhau, sẽ dẫn đến sự thay đổi tốc độ sinh trưởng của tế bào và năng suất sản phẩm (Donovan và cs., 1996).

3.3. Tối ưu nồng độ chất cảm ứng IPTG biểu hiện protein kháng nguyên P102 tái tổ hợp

Ảnh hưởng của chất cảm ứng IPTG với các nồng độ khác nhau: 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 mM ở OD₆₀₀ đạt 0,8 trong môi trường nuôi cấy tối ưu YJ, nhiệt độ cảm ứng tối ưu 30°C, thời gian nuôi cấy sau cảm ứng 8 giờ lên khả năng biểu hiện của protein P102 được trình bày trên Hình 3.



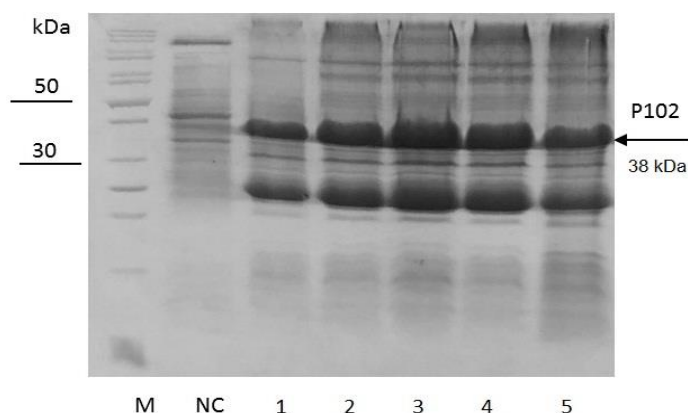
Hình 3. Biểu hiện protein P102 tái tổ hợp với các nồng độ chất cảm ứng IPTG khác nhau. M: Marker protein (10 - 200 kDa Bio-Basic); NC: Tế bào *E. coli* tái tổ hợp không được cảm ứng bằng IPTG; 1-5: Biểu hiện protein P102 tái tổ hợp sau khi cảm ứng bằng IPTG với các nồng độ tương ứng 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 mM khi OD₆₀₀ môi trường YJ đạt 0,8, nhiệt độ cảm ứng 30°C, thời gian nuôi cấy sau cảm ứng 8 giờ

Kết quả phân tích điện di biểu hiện protein P102 tái tổ hợp (Hình 3) cho thấy nồng độ chất cảm ứng IPTG có ảnh hưởng đến quá trình biểu hiện của protein P102. Biểu hiện protein P102 tái tổ hợp thấp ở nồng độ chất cảm ứng 0,2 mM IPTG (làn 1), tăng dần ở nồng độ 0,4 mM IPTG (làn 2) và ổn định ở các nồng độ 0,6, 0,8 và 1,0 mM IPTG (làn 3, 4 và 5). Do vậy, nồng độ IPTG 0,6 mM được chọn là nồng độ tối ưu cho biểu hiện protein P102, và được sử dụng trong các thí nghiệm tối ưu tiếp theo. Theo Bentley và cs. (1990): biểu hiện protein tái tổ hợp nói chung gây ra gánh nặng trao đổi chất về năng lượng, carbon và axit amin cho tế bào, dẫn đến tốc độ sinh trưởng của tế bào, biểu hiện protein và tính ổn định của plasmid giảm, vì vậy cần thay đổi nồng độ IPTG cảm ứng để điều chỉnh gánh nặng trao đổi chất

(Donovan và cs., 1996). Mặt khác, theo Bentley và cs. (1991): khi sử dụng vector biểu hiện pET200/D-TOPO mang promoter T7 (như trong nghiên cứu hiện tại), nồng độ IPTG cảm ứng phải được tối ưu để cân bằng việc giảm số lượng tế bào tái tổ hợp sau khi cảm ứng IPTG, bằng việc tăng sản lượng protein sản xuất.

3.4. Tối ưu thời điểm cảm ứng IPTG biểu hiện protein kháng nguyên P102 tái tổ hợp

Ảnh hưởng của thời điểm cảm ứng 0,6 mM IPTG vào môi trường YJ ở các mật độ quang (OD₆₀₀) khác nhau: 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 và 1,5, tốc độ lắc 150 vòng/phút, nhiệt độ cảm ứng 30°C, thời gian nuôi cấy sau cảm ứng là 8 giờ lên biểu hiện protein kháng nguyên P102 được trình bày trên Hình 4.



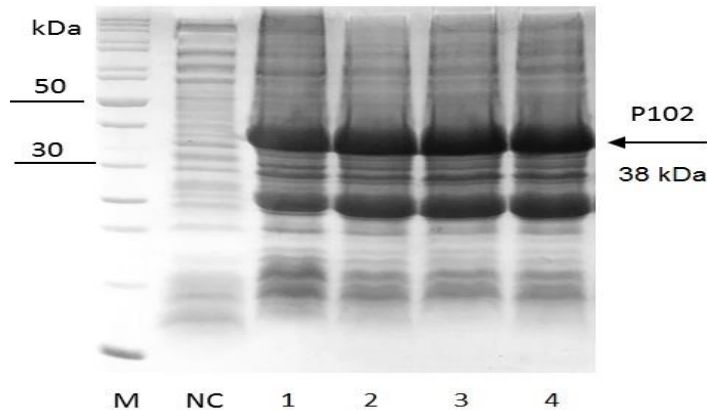
Hình 4. Biểu hiện protein tái tổ hợp P102 ở các thời điểm cảm ứng IPTG khác nhau. M: Marker protein (10 - 200 kDa Bio-Basic); NC: Tế bào *E. coli* tái tổ hợp không được cảm ứng bằng IPTG; 1-5: Biểu hiện protein P102 ở các thời điểm cảm ứng có mật độ quang (OD_{600}) khác nhau 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 và 1,5 trong môi trường YJ, nồng độ 0,6 mM IPTG, nhiệt độ cảm ứng 30°C, thời gian nuôi cấy sau cảm ứng 8 giờ

Kết quả biểu hiện protein P102 tái tổ hợp cho thấy lượng protein đích tăng dần ở thời điểm cảm ứng có mật độ quang (OD_{600}) đạt 0,4 (lần 1) và 0,6 (lần 2). Biểu hiện protein P102 cao nhất ở thời điểm cảm ứng có mật độ quang đạt 0,8 (lần 3), sau đó lượng protein biểu hiện giảm dần khi cảm ứng ở mật độ quang 1,0 (lần 4) và 1,5 (lần 5). Như vậy, thời điểm cảm ứng thích hợp để thu được lượng protein P102 tái tổ hợp cao là tại giá trị OD_{600} môi trường YJ đạt 0,8. Kết quả này phù hợp với các báo cáo trước đây cho rằng lượng protein tái tổ hợp thu được từ quá trình lên men phụ thuộc vào thời điểm cảm ứng trong chu kỳ tăng trưởng (Donovan và cs., 1996), và mức độ biểu hiện của protein tái tổ hợp ở *E. coli* tăng lên đến giai đoạn lũy thừa muộn và giảm trong

giai đoạn tăng trưởng tĩnh (Candan và cs., 1998; Malik và cs., 2016).

3.5. Tối ưu thời gian nuôi cấy sau cảm ứng IPTG biểu hiện protein kháng nguyên P102 tái tổ hợp

Tối ưu thời gian nuôi cấy sau cảm ứng IPTG được thực hiện trong 2, 4, 6 và 8 giờ với các điều kiện nuôi cấy đã được tối ưu: tế bào *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp được nuôi cấy trong môi trường YJ, nhiệt độ cảm ứng 30°C, nồng độ chất cảm ứng 0,6 mM IPTG, thời điểm cảm ứng (OD_{600} của môi trường) đạt 0,8. Kết quả điện di kiểm tra mức độ biểu hiện protein P102 trên gel 15% SDS-PAGE được trình bày ở Hình 5.



Hình 5. Biểu hiện protein P102 tái tổ hợp với các thời gian nuôi cấy sau cảm ứng IPTG khác nhau. M: Marker protein (10 - 200 kDa Bio-Basic); NC: Tế bào *E. coli* tái tổ hợp không được cảm ứng IPTG; 1-4: Biểu hiện protein P102 tái tổ hợp với các thời gian nuôi cấy sau cảm ứng tương ứng là 2, 4, 6 và 8 giờ trong môi trường YJ, nồng độ 0,6 mM IPTG, OD₆₀₀ môi trường đạt 0,8, nhiệt độ cảm ứng 30°C

Kết quả phân tích điện di cho thấy protein P102 được tổng hợp mạnh sau 2 giờ cảm ứng bằng 0,6 mM IPTG (lần 1), lượng protein tổng hợp tăng nhẹ sau 4 giờ (lần 2) đạt giá trị cao nhất và ổn định sau 6 giờ (lần 3) và 8 giờ cảm ứng (lần 4). Do vậy, thời gian 6 giờ được chọn làm khoảng thời gian nuôi cấy tối ưu sau cảm ứng cho quá trình biểu hiện protein kháng nguyên P102 tái tổ hợp.

Đã có nhiều nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng sau khi cảm ứng bằng IPTG vào môi trường, protein đích bắt đầu được tổng hợp và thời gian nuôi cấy sau cảm ứng là cần thiết cho việc sản xuất protein tái tổ hợp. Thời gian nuôi cấy sau cảm ứng IPTG ảnh hưởng đến việc hoàn chỉnh gấp khúc, sự tích tụ và năng suất protein tái tổ hợp ở *E. coli* (Wong và cs., 1998), và chịu ảnh hưởng của một số yếu tố như promotor, nồng độ chất cảm ứng, khả năng hòa tan và đặc tính của protein tái tổ hợp (Nôi và Chung, 2017).

4. KẾT LUẬN

Các điều kiện nuôi cấy (nhiệt độ cảm ứng, môi trường nuôi cấy, nồng độ IPTG, thời điểm cảm ứng và thời gian nuôi cấy sau cảm ứng) cho biểu hiện protein kháng nguyên P102 tái tổ hợp trong tế bào *E. coli*

BL21 (DE3) đã được nghiên cứu tối ưu. Nhiệt độ cảm ứng 30°C, môi trường nuôi cấy YJ, nồng độ chất cảm ứng IPTG 0,6 mM, thời điểm cảm ứng ở mật độ quang (OD₆₀₀) môi trường đạt 0,8 và thời gian nuôi cấy sau cảm ứng 6 giờ là các thông số tối ưu cho biểu hiện protein kháng nguyên P102 tái tổ hợp của *Mh* trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

- Đặng Xuân Bình và Đặng Thị Mai Lan. (2011). Nghiên cứu tình hình mang khuẩn *Mycoplasma hyopneumoniae* gây bệnh suyễn ở lợn nái sinh sản tại các trang trại chăn nuôi công nghiệp tập trung trên một số địa bàn một số tỉnh miền Bắc Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 85(9), 63 - 67.
- Huỳnh Văn Chương, Đinh Thị Bích Lân, Nguyễn Quang Vinh, Lê Đức Thọ, Lê Văn Phước và Lê Xuân Ánh. (2011). Đáp ứng kháng thể sau tiêm vaccine phòng bệnh do *Mycoplasma hyopneumoniae* gây ra ở lợn. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, XVIII(2), 17-22.
- Trần Thị Dân, Hồ Thị Kim Hoa, Nguyễn Phước Ninh, Quách Tuyết Anh, Lê Minh Hồng Anh và Nguyễn Ngọc Tuấn. (2003). Dùng kỹ thuật khuếch đại gen (PCR) để phát hiện *Mycoplasma hyopneumoniae* ở heo. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Nông Lâm Nghiệp*, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh, 3, 75-78.

Phùng Thăng Long, Lê Viết Quân, Đồng Hữu Rin, Lê Quốc Việt, Đặng Thị Hương, Nguyễn Thị Thu Hiền và Đinh Thị Bích Lan. (2021). Tạo dòng và biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên P102 của *Mycoplasma Hyopneumoniae* trong *E. Coli* B1 21(DE3). *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y*, 28(5), 38-44.

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

- Austen, Y. C., Scott, R. F., Judy, F. F., Grant, D., & Mukkur, T.K.S (2006). Evaluation of the immunogenicity of the P97R1 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* as a mucosal vaccine in mice. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 923-929.
- Bentley, W. E., Mirjalili, N., Anderson, D. C., Davis, R. H., & Compala, D. S. (1990). Plasmid encoded protein: the principal factor of "metabolic burden" associated with recombinant bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 35, 668-681.
- Bentley, W. E., Davis, R. H., & Compala, D. S. (1991). Dynamics of CAT expression in *E. coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 38, 749-760.
- Bogema, D. R., Scott, N. E., Padula, M. P., Tacchi, J. L., Raymond, B. B. A., Jenkins, C., Cordwell, S. J., Minion, F. C., Walker, M. J., & Djordjevic, S. P. (2011). Sequence TTKF QE defines the site of proteolytic cleavage in Mhp683 protein, a novel glycosaminoglycan and cilium adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 41217-41229.
- Candan, Y. I. Z., & Betul, K. (1998). Optimization of starting time and period of induction and inducer concentration in the production of the restriction enzyme EcoRI from recombinant *Escherichia coli* 294. *Turkish Journal of Chemistry*, 22, 221-226.
- Donovan, R. S., Robinson, C. W., & Glick, B. R. (1996). Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *Journal of Industrial Microbiology*, 16(3), 145-154.
- Farewell, A., & Neidhardt, F. C. (1998). Effect of temperature on in vivo protein synthetic capacity in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180, 4704-4710.
- Galli, V., Simionatto, S., Marchioro, S. B., Klabunde, G. H. F., Conceição, F. R., & Dellagostin, O. A. (2013). Recombinant secreted antigens from *Mycoplasma* delivered as a cocktail vaccine enhance the immune response of mice. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(9), 1370-1376.
- Lee, H. W., Yoon, S. J., Kim, H. K., Park, K. M., Oh, T. K. & Jung, J. K. (2000). Overexpression of an alkaline lipase gene from *Proteus vulgaris* K80 in *Escherichia coli* BL21/pKLE. *Biotechnology Letters*, 22, 1543-1547.
- Loc, N. H., Quang, H. T., Lam, B. T. H., & Trang, D. T. T. (2011). The effects of culture conditions on neutral protease (NPRC10) in a recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Annals of Biological Research*, 2(3), 474-485.
- Loc, N. H., Ngoc, L. M. T., Lan, T. T., Viet, L. Q., Thao, L. D., Quang, H. T., Lan, D. T. B., & Long, P. T. (2013). Cloning and expression of genes encoding F107-C and K88-1NT fimbrial proteins of enterotoxigenic *Escherichia coli* from piglets. *Indian Journal of Microbiology*, 53(4), 488-491.
- Malik, A., Alsenaidy, A. M., Elrobh, M., Khan, W., Alanazi, M. S., & Bazzi, M. D. (2016). Optimization of expression and purification of HSPA6 protein from *Camelus dromedarius* in *E. coli*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(3), 410-419.
- Miksch, G., Ryu, S., & Risse, J. M. (2008). Factors that influence the extracellular expression of streptavidin in *Escherichia coli* using a bacteriocin release protein. *Application of Gene Molecular Biotechnology*, 10, 124-129.
- Noi, N. V., & Chung, Y. C. (2017). Optimization of expression and purification of recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike (PEDV-S1) protein in *Escherichia coli*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(3), 619-629.
- Pathak, K. B., Biswas, S. K., Tembhrne, P. A., Hosamani, M., Bhanuprakash, V., Gaya, Prasad., Singh, R. K., Rasool, T. J., & Mondal, B. (2008). Prokaryotic expression of truncated VP7 of bluetongue virus (BTV) and reactivity of the purified recombinant protein with all BTV type-specific sera. *Journal of Virological Methods*, 152, 6-12.
- Phung Thang Long, Le Quoc Viet, Le Viet Quan, Dong Huu Rin, Nguyen Xuan Hoa, Le Duc Thao, Le Dinh Phung, Nguyen Thi Hien, & Dinh Thi Bich Lan (2019). Cloning and Optimizing the Culture Parameters for

- Expression of R1 and R2 Repeat Regions of P97 Adhesin from *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli*. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 7(12), 1067-1075.
- Schein, C. H., & Noteborn, M. H. M. (1988). Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Nature Biotechnology*, 6(3), 291-294.
- Seymour, L. M., Deutscher, A. T., Jenkins, C., Kuit, T. A., Falconer, L., Minion, F. C., Crossett, B., Padula, M., Dixon, N. E., Djordjevic, S. P., & Walker, M. J. (2010). A processed multidomain *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin binds fibronectin, plasminogen, and swine respiratory cilia. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 33971-33978.
- Simionatto, S., Marchioro, S. B., Galli, V., Brum, C., B., Klein, C. S., Rebelatto, R., Silva, E. F., Borsuk, S., Conceição, F. R., & Dellagostin, O. A. (2012). Immunological characterization of *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant proteins. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35(2), 209-216.
- Sheldrake, R. F., Gardner, I. A., Saunders, M. M., & Romalis, L. F. (1991). Intraperitoneal vaccination of pigs to control *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Research in Veterinary Science*, 51(3), 285-291.
- Shen, Y., Lao, X. G., Chen, Y., Zhang, H. Z., & Xu, X. X. (2007). High-level expression of cecropin X in *Escherichia coli*. *International Journal of Molecular Sciences*, 8, 478-491.
- Thacker, E. L., Straw, B. E., Mengeling, W. L., and Taylor, D. J. (2006) *Diseases of Swine*, The Iowa State University Press, Ames, IA, 701-717.
- Thacker, E. L., Thacker, B. J., Boettcher, T. B., & Jayappa, H. (1998). Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation and production induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. *Swine Health and Production*, 6(3), 107-112.
- Wong, H. H, Kim, Y. C., Lee, S. Y., & Chang, H. N. (1998). Effect of post-induction nutrient feeding strategies on the production of bioadhesive protein in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 60(3), 271-276.