

CẢI THIỆN MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN KHÁNG NGUYÊN TÁI TỔ HỢP 3-1E CỦA *EIMERIA* TRONG *ESCHERICHIA COLI* BL21 (DE3)

*Đinh Thị Bích Lân¹, Phùng Thăng Long²,
Huỳnh Văn Chương¹, Đặng Thanh Long¹,
Hoàng Tấn Quảng¹, Lê Đức Thọ¹, Lê Quốc Việt¹,
Lê Công Thịnh¹, Đặng Thị Hương¹, Hoàng Thị Thùy Nhung¹*

TÓM TẮT

Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu này nhằm cải thiện mức độ biểu hiện kháng nguyên tái tổ hợp 3-1E trong tế bào *E. coli* chủng BL21 (DE3) mang gen kháng nguyên 3-1E của cầu trùng *Eimeria*. Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường nuôi cấy LB cho khả năng sinh trưởng tốt nhất của chủng *E. coli* BL21 (DE3) với tỷ lệ tiếp giống 2% (OD600 = 0,8), lắc 200 vòng/phút ở 37°C sau 11 giờ nuôi cấy. Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của protein dung hợp 6xHis-3-1E lại cho kết quả tốt nhất trên môi trường YJ trong cùng một điều kiện tối ưu (nồng độ chất cảm ứng IPTG là 0,8 mM, nuôi lắc ở 200 vòng/phút, nhiệt độ cảm ứng 20°C trong thời gian 10 giờ). Sắc ký lọc gel 6xHis cho thấy sản phẩm protein dung hợp 6xHis-3-1E có khối lượng phân tử vào khoảng 26 kDa.

Từ khóa: Protein dung hợp, *E. coli* BL21 (DE3), 3-1E, *Eimeria*

Enhancing expression level of recombinant antigen 3-1E of *Eimeria* in *Escherichia coli* BL21 (DE3)

*Đinh Thị Bích Lan, 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*

SUMMARY

Improvement of the recombinant antigen expression level in *E. coli* strain BL21 Star™(DE3) encoding gene 3-1E of *Eimeria* was conducted. The studied result showed that LB medium has given the best growth of *E. coli* BL21 (DE3) in comparison with other media in the same 2 % initial seed inoculum size (OD600 = 0,8), shaking 200 rpm at 37°C for 11 hrs. However, the highest level of fusion protein (6xHis-3-1E) was obtained from YJ medium in the same optimum culture condition (0.8 mM IPTG-Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside for 10hrs. at 20°C). Molecular weight of purified 6xHis-3-1E protein from 6xHis affinity chromatography was about 26 kDa.

Keywords: Fusion protein, *E. coli* BL21 (DE3), 3-1E, *Eimeria*.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cầu trùng gà là một bệnh ký sinh trùng lây truyền nguy hiểm thường gặp, đã và đang gây nhiều thiệt hại cho ngành chăn nuôi gà. Cho đến nay, bệnh đã phổ biến ở khắp mọi nơi trên thế giới, trong đó có Việt Nam. Bệnh có tốc độ lây

lan nhanh, đặc biệt ở gà thả vườn theo phương thức nuôi tập trung. Không những chỉ gây chết với tỷ lệ cao ở gà con, bệnh còn làm tăng số gà còi cọc, giảm tốc độ sinh trưởng cho toàn đàn, làm giảm sản lượng trứng từ 20-40% ở gà đẻ, tăng tiêu tốn thức ăn.

Áp dụng công nghệ protein tái tổ hợp để sản xuất kháng nguyên tái tổ hợp 3-1E và dùng

¹Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

²Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

kháng nguyên này để gây tối miễn dịch cho gà sẽ tạo được kháng thể có khả năng chống lại đồng thời nhiều loài cầu trùng. Đây là lợi thế của phương pháp tiếp cận mới có áp dụng công nghệ cao so với các phương pháp tách chiết kháng nguyên truyền thống.

Protein 3-1E là một kháng nguyên bề mặt, tồn tại ở giai đoạn sporozoites và merozoites của một số loài *Eimeria* như *Eimeria acervulina*, *E. tenella*, *E. maxima* [7,8].

Nhiều nghiên cứu về tạo dòng và biểu hiện kháng nguyên 3-1E từ *Eimeria* cũng đã được thực hiện. Kháng nguyên 3-1E tái tổ hợp đã được sử dụng làm vaccin chống lại *E. acervulina*, *E. tenella*, và *E. maxima* [7]. Tiêm chủng bằng vaccin ADN dựa trên gen 3-1E cũng gây ra đáp ứng miễn dịch chống lại cầu trùng gà [7,8]. Chúng tôi đã biểu hiện thành công kháng nguyên 3-1E tái tổ hợp trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3). Để sản xuất kháng nguyên tái tổ hợp chất lượng cao với giá thành thấp, việc nghiên cứu nhằm cải thiện mức độ biểu hiện kháng nguyên tái tổ hợp 3-1E là rất cần thiết.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp mang gen mã hóa kháng nguyên 3-1E trong các môi trường với các điều kiện khác nhau nhằm tối ưu hóa quy trình sản xuất kháng nguyên tái tổ hợp 3-1E.

II. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

- Tế bào *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp có chứa vector pET200/D-TOPO (Invitrogen, USA) mang gen mã hóa kháng nguyên 3-1E [5].

- Môi trường LB: 0,5% dịch chiết nấm men, 1% tryptone và 1% NaCl [19].

- Môi trường SOB: 2% peptone, 0,5% dịch chiết nấm men, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ và 10 mM MgSO₄ [17].

- Môi trường SOC: môi trường SOB và 20 mM glucose [17].

- Môi trường TB: 1,2% peptone, 2,4% dịch chiết nấm men, 72 mM K₂HPO₄, 17 mM KH₂PO₄, và 0,4% glycerol [17].

- Môi trường YJ: 2% glycerol, 1,5% tryptone, 2% dịch chiết nấm men, 0,25% K₂HPO₄.12H₂O, 0,16% KH₂PO₄, 0,05% NaCl, và 0,025% MgSO₄.7H₂O [22].

- Môi trường M9ZB cải tiến: 1% Na₂HPO₄.12H₂O, 0,3% KH₂PO₄, 0,05% NaCl, 1% (NH₄)₂SO₄, 0,2% MgSO₄.7H₂O, 1,5% glucose, 1% tryptone và 1% dịch chiết nấm men [12].

- Môi trường HSG: 1,49% glycerol, 0,7% dịch chiết nấm men, 1,35% tryptone, 0,14% MgSO₄.H₂O, 0,15% KH₂PO₄, 0,23% K₂HPO₄, và 0,5% glycine [15].

Hóa chất dùng để pha các loại môi trường trên đều là sản phẩm của hãng Merck, Đức.

- IPTG của hãng Biorad, Mỹ

- ProBond™ Purification System kit (Invitrogen, USA)

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nuôi cấy vi khuẩn

Chủng *E. coli* BL21(DE3) tái tổ hợp mang gen mã hóa kháng nguyên 3-1E của *Eimeria* được nuôi cấy trong 50 ml các môi trường có bổ sung kanamycin (50 µg/ml), ở các nhiệt độ, thời gian nuôi cấy, tốc độ lắc, nồng độ chất cảm ứng IPTG, mật độ tế bào trước khi bổ sung chất cảm ứng trong các thời gian cảm ứng khác nhau, tùy theo từng thí nghiệm cụ thể.

Thu nhận và tinh sạch kháng nguyên tái tổ hợp

Sau khi nuôi cấy, sinh khối tế bào được thu nhận bằng cách ly tâm 6.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C và tái huyền phù trong TNE (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA) + 1% Triton X-100 + 1 mg/ml lysozyme), ủ trong đá 60 phút, sau đó siêu âm 5 phút và ly tâm 15.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Kháng nguyên tái tổ hợp 3-1E được tinh sạch bằng gel

ProBond™ Purification System kit (Invitrogen, USA). Mức độ biểu hiện protein được phân tích bằng điện di SDS-PAGE 15%.

Phân tích số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu sinh trưởng được tính giá trị trung bình và phân tích ANOVA (Duncan's test, $p < 0,05$) bằng chương trình SAS.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng sinh trưởng của *E.coli* BL21

Bảng 1. Sinh trưởng của chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang gen mã hóa kháng nguyên 3-1E ở các môi trường khác nhau

Môi trường	Mật độ tế bào (OD_{600})
	3-1E
LB	2,952 ^a
TB	2,843 ^b
YJ	2,469 ^d
SOC	2,183 ^e
SOB	2,714 ^b

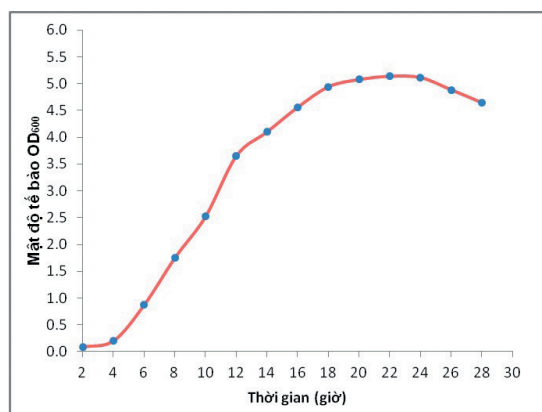
Kết quả bảng 1 cho thấy môi trường LB cho mật độ tế bào cao nhất ($OD_{600} = 2,952$; $p < 0,05$) so với 4 loại môi trường còn lại là YJ, SOB, SOC và TB. Môi trường LB cũng được nhiều tác giả sử dụng trong nuôi cấy sinh khối *E. coli* trước khi sản xuất các protein tái tổ hợp. Chẳng hạn, sản xuất protein beta-defensin-4 của người, enzyme BAE16 của *B. nematocida*, zinc-metalloprotease của *Salinivibrio* sp. AF-2004 [3].

3.2. Khảo sát đường cong sinh trưởng

Chúng tôi khảo sát đường cong sinh trưởng của vi khuẩn *E. coli* chủng BL21 (DE3) tái tổ hợp mang gen mã hóa kháng nguyên 3-1E trên 50 mL môi trường LB có bổ sung 50 μ g/mL kanamycin trong cùng một điều kiện (thời gian nuôi 28 giờ ở 37°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút, tỷ lệ tiếp giống là 0,1% (v/v, $OD_{600} = 0,8$). Mật độ tế bào được đo ở OD_{600nm} tại thời điểm 2, 4, 6, 8,

(DE3) tái tổ hợp mang gen mã hóa kháng nguyên 3-1E của *Eimeria* trong các loại môi trường khác nhau

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) trong cùng điều kiện (tỷ lệ tiếp giống 2%, sinh trưởng ở 37°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút). Sau 11 giờ nuôi cấy, khả năng sinh trưởng của vi khuẩn *E. coli* được xác định bằng cách đo mật độ tế bào ở bước sóng 600 nm (OD_{600}). Kết quả được thể hiện ở bảng 1.



Hình 1. Đường cong sinh trưởng của chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang gen mã hóa kháng nguyên 3-1E

10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 và 28 giờ nuôi. Đường cong sinh trưởng được xây dựng bằng phần mềm Excel 2007 để tìm thời điểm sản xuất sinh khối tối ưu. Kết quả cho thấy pha thích nghi

kéo dài từ 0 - 4 giờ, pha sinh trưởng bắt đầu từ 4 giờ và kéo dài cho đến 18 giờ, đạt giá trị sinh khối cao nhất $OD_{600} = 5,076$, pha cân bằng bắt đầu từ 18 giờ và kéo dài đến 24 giờ và cuối cùng là pha chết (hình 1). Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu trước đây của chúng tôi trên chủng *E. coli* BL21 (DE3) chứa vector

tái tổ hợp mang gen Cp23 [1].

3.3. Tỷ lệ tiếp giống tối ưu

Ảnh hưởng của các tỷ lệ tiếp giống đến khả năng sinh trưởng của tế bào *E. coli* tái tổ hợp được xác định dựa trên mật độ tế bào (OD_{600}) sau 11 giờ nuôi. Kết quả được thể hiện ở bảng 2

Bảng 2. Sinh trưởng của chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang gen mã hóa kháng nguyên 3-1E ở các tỷ lệ tiếp giống khác nhau

Tỷ lệ tiếp giống (%)	Mật độ tế bào (OD_{600})
	3-1E
0,1	2,243 ^d
0,5	2,710 ^c
1	2,888 ^b
2	3,191 ^a
3	2,936 ^b
4	2,935 ^b
5	2,931 ^b

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Kết quả ở bảng 2 cho thấy có sự sai khác về mật độ tế bào giữa các tỷ lệ tiếp giống khác nhau trên môi trường YJ ($p < 0,05$), trong đó tỷ lệ tiếp giống 2% ($OD_{600} = 0,8$) cho kết quả tốt nhất.

3.4. Tốc độ lắc tối ưu

Trên môi trường LB với tỷ lệ tiếp giống là 2%, sinh trưởng ở 37°C, chúng tôi tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của tốc độ lắc (150, 180, 200, 220 và 250 vòng/phút) lên khả năng sinh trưởng của vi khuẩn *E. coli* chủng BL21 (DE3) tái tổ hợp mang gen 3-1E của *Eimeria*.

Bảng 3. Sinh trưởng của chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang gen mã hóa kháng nguyên 3-1E ở các tốc độ lắc khác nhau

Tốc độ lắc (Vòng/phút)	Mật độ tế bào (OD_{600})
	3-1E
150	2,065 ^d
180	2,745 ^b
200	3,008 ^a
220	2,714 ^b
250	2,532 ^c

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Kết quả ở bảng 3 cho thấy ở các tốc độ lắc khác nhau thì mật độ tế bào khác nhau sau 11 giờ nuôi cấy và đạt cực đại ở tốc độ 200 vòng/phút ($OD_{600} = 3,008$), với tốc độ lắc cao hơn thì

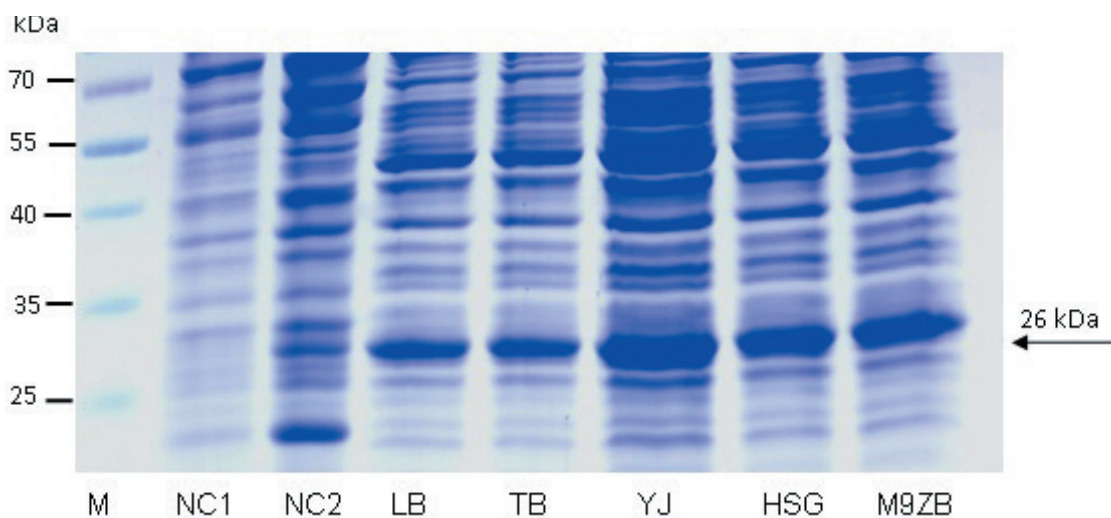
mật độ tế bào bắt đầu giảm (từ 220 vòng/phút đến 250 vòng/phút). Điều này có thể do tốc độ lắc quá nhanh làm môi trường nuôi cấy bị tạo nhiều bọt, làm giảm khả năng tiếp xúc của tế

bào đối với các thành phần của môi trường, ảnh hưởng đến sự hô hấp của tế bào.

3.5. Môi trường biểu hiện tối ưu

Thành phần môi trường là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến khả năng biểu hiện của protein tái tổ hợp. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cho thấy môi trường thích hợp cho nhân giống sinh khối có thể không thích hợp cho sản xuất protein tái tổ hợp [12]. Chúng tôi đã khảo sát khả năng biểu hiện của protein dung hợp 6xHis-3-1E trên 5 loại môi trường với các thành phần khác nhau (LB, YJ, TB, HSG và M9ZB cải tiến). Thí nghiệm được tiến hành trong cùng một điều kiện (cảm ứng với 0,8 mM IPTG, lắc 200 vòng/phút, ở 37°C trong thời gian

10 giờ) trên gel SDS-PAGE chỉ ra rằng môi trường YJ cho kết quả biểu hiện kháng nguyên tái tổ hợp 3-1E tốt nhất, tiếp đến là môi trường HSG và M9ZB cải tiến, môi trường LB và TB không thích hợp cho biểu hiện sản xuất kháng nguyên tái tổ hợp 3-1E trong quy mô phòng thí nghiệm nên cho hàm lượng kháng nguyên thấp nhất (hình 2). Thăm dò thành phần môi trường biểu hiện cho sản xuất protein tái tổ hợp được nhiều tác giả nghiên cứu. Chẳng hạn, Shen và cs (2007) cho thấy cecropin X biểu hiện mạnh trong môi trường LB so với các môi trường TB, SOB và SOC, Nguyễn Hoàng Lộc và cs (2014) cho thấy môi trường thích hợp cho sự biểu hiện của kháng nguyên bám dính K88-1NT là M9ZB cải tiến [2].



Hình 2. Ảnh hưởng của môi trường lên mức độ biểu hiện kháng nguyên tái tổ hợp 3-1E

M là Marker protein (10 -170 kDa), NC1: *E. coli* không mang vector tái tổ hợp sinh trưởng ở 37°C trên môi trường LB; NC2: *E. coli* mang vector tái tổ hợp không bổ sung chất cảm ứng bằng IPTG sinh trưởng ở 37°C trên môi trường LB; LB, TB, YJ, HSG, M9ZB là các môi trường được sử dụng để biểu hiện kháng nguyên.

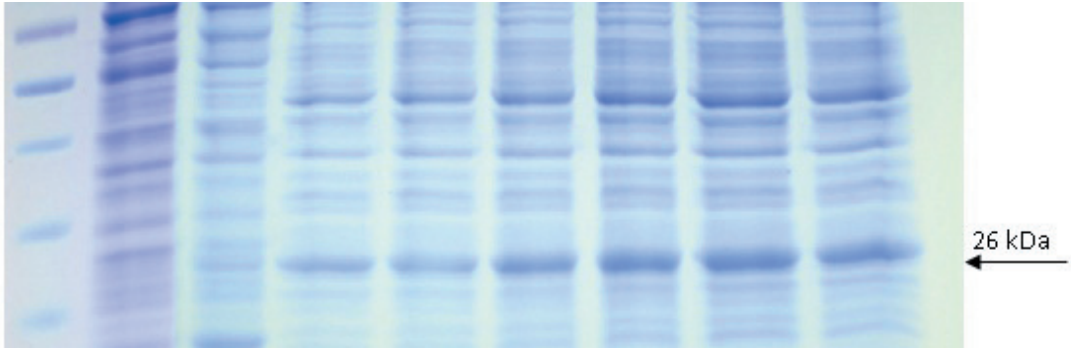
3.6. Nồng độ tối ưu của chất cảm ứng IPTG

Nồng độ và thời gian của chất cảm ứng có ảnh hưởng lớn đến hiệu suất biểu hiện của protein tái tổ hợp. Để xác định nồng độ tối ưu của IPTG (BioRad) sử dụng cho cảm ứng biểu hiện kháng nguyên 3-1E trên môi trường YJ với nhiệt độ cảm ứng 37°C, lắc 200 vòng/phút trong thời gian

10 giờ, chúng tôi sử dụng IPTG với các nồng độ từ 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 và 1,2 mM. Kết quả điện di trên gel SDS-PAGE 15% cho thấy kháng nguyên tái tổ hợp 3-1E bắt đầu tổng hợp khi bổ sung với 0,2 mM IPTG và đạt giá trị cao nhất ở nồng độ IPTG 0,8 - 1,0 mM. Vì vậy, chúng tôi chọn nồng độ 0,8 mM IPTG cho các thí nghiệm sau này (Hình 3). Nhiều nghiên cứu cho thấy,

nồng độ chất cảm ứng IPTG có ảnh hưởng lớn đến hiệu suất biểu hiện của protein tái tổ hợp. Chẳng hạn, nồng độ chất cảm ứng IPTG tối ưu

để sản xuất protein tái tổ hợp YLR31W trong nấm men nằm trong khoảng 50 - 500 μM với nhiệt độ cảm ứng là 18°C [6].



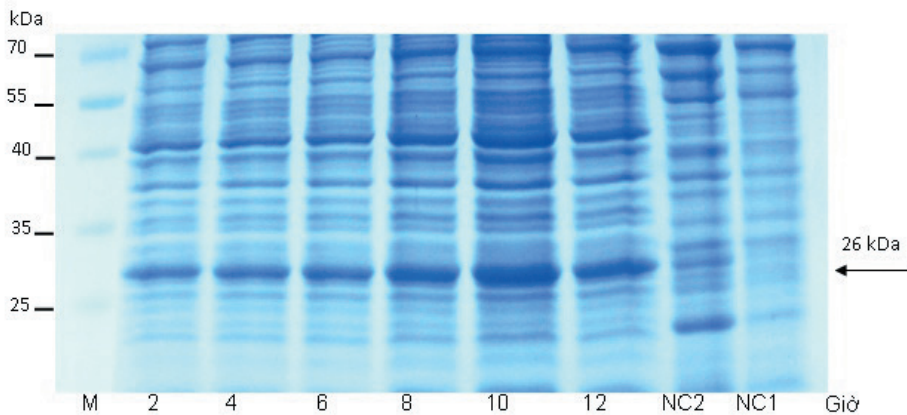
Hình 3. Kết quả biểu hiện kháng nguyên 3-1E tái tổ hợp ở các nồng độ IPTG khác nhau

M là Marker protein (10 -170 kDa), NC1: *E. coli* không mang vector tái tổ hợp sinh trưởng ở 37°C trên môi trường LB; NC2: *E. coli* mang vector tái tổ hợp không bổ sung chất cảm ứng bằng IPTG sinh trưởng ở 37°C trên môi trường LB; 0,2 ; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 và 1,2 là nồng độ IPTG.

3.7. Thời gian cảm ứng tối ưu

Nghiên cứu cho thấy thời gian cảm ứng có ảnh hưởng lớn đến khả năng biểu hiện của các protein tái tổ hợp khác nhau [1,3]. Chúng tôi tiến hành khảo sát thời gian cảm ứng của IPTG tối ưu với các thời điểm là 2, 4, 6, 8, 10 và 12 giờ được nuôi cấy trong cùng điều kiện (0,8 mM

IPTG, lắc 200 vòng/phút ở 37°C). Kết quả điện di thu được sau khi phá vỡ tế bào trên gel SDS-PAGE 15% cho thấy thời gian cảm ứng 10 giờ cho nồng độ protein 3-1E tái tổ hợp cao nhất. Vì vậy, thời gian 10 giờ là thích hợp cho cảm ứng biểu hiện protein tái tổ hợp 3-1E với 0,8 mM IPTG (BioRad) (Hình 4).



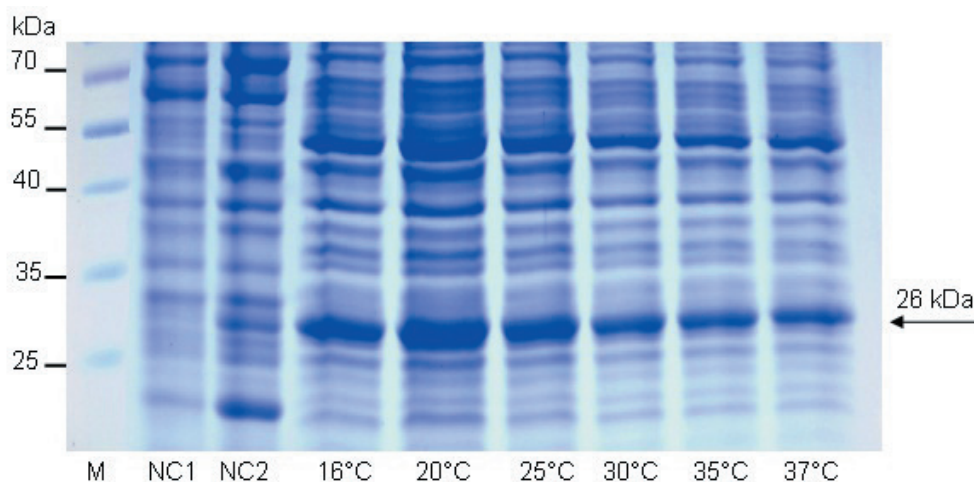
Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian cảm ứng lên sản xuất kháng nguyên tái tổ hợp 3-1E

M- Marker protein (10 -170 kDa), NC1: *E. coli* không mang vector tái tổ hợp sinh trưởng ở 37°C trên môi trường LB; NC2: *E. coli* mang vector tái tổ hợp không bổ sung chất cảm ứng bằng IPTG sinh trưởng ở 37°C trên môi trường LB; 2, 4, 6, 8, 10, 12 là thời gian cảm ứng với 0,8 mM IPTG.

3.8. Nhiệt độ cảm ứng tối ưu

Để xác định thời gian cảm ứng tối ưu, chúng tôi đã tiến hành khảo sát nhiệt độ cảm ứng IPTG ở 16, 20, 25, 30, 35 và 37°C sau khi đã nuôi tăng sinh *E. coli* ở 37°C đến khi mật độ tế bào đạt một giá trị ($OD_{600} = 0,8-1,0$).

Kết quả nghiên cứu cho thấy nhiệt độ thích hợp nhất để sản xuất kháng nguyên tái tổ hợp 3-1E dao động từ 16 - 37°C, trong đó, sự biểu hiện ở 20°C cho hiệu quả cao nhất và ổn định nhất qua nhiều lần lặp lại thí nghiệm (Hình 5).



Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ cảm ứng lên sản xuất kháng nguyên 3-1E

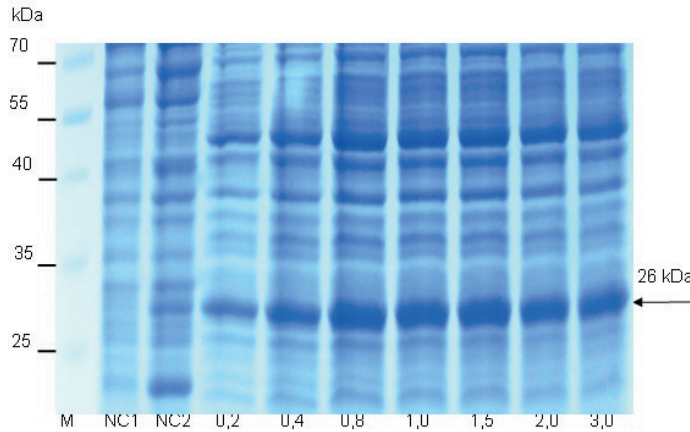
M là Marker protein (10 -170 kDa), *NC1*: *E. coli* không mang vector tái tổ hợp sinh trưởng ở 37°C trên môi trường LB; *NC2*: *E. coli* mang vector tái tổ hợp không bổ sung chất cảm ứng bằng IPTG sinh trưởng ở 37°C trên môi trường LB.

3.9. Mật độ tế bào tối ưu

Nhiều tác giả đã chứng minh giai đoạn sinh trưởng của tế bào mà tại đó protein được cảm ứng biểu hiện có ảnh hưởng lớn đến sự tổng hợp và khả năng hoạt động của protein, vì vậy, cần thiết phải tối ưu mật độ tế bào trước khi bổ sung chất cảm ứng để biểu hiện mạnh protein tái tổ hợp [6]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã khảo sát ảnh hưởng của mật độ tế bào tại các giai đoạn sinh trưởng khác nhau lên quá trình sản xuất kháng nguyên tái tổ hợp 3-1E (OD_{600} từ 0,5-4). Kết quả cho thấy khả năng sinh tổng hợp kháng nguyên 3-1E đạt giá trị cao nhất khi

mật độ tế bào trước lúc bổ sung chất cảm ứng là $OD_{600} = 0,8$ (hình 6).

Nghiên cứu của Matsumoto và cs (2002) cho thấy mật độ tế bào đạt OD_{600} bằng 0,5 là thời điểm thích hợp nhất để bổ sung IPTG, cảm ứng sự biểu hiện lyase từ *B. subtilis* IFO3134 [16] thấp hơn kết quả chúng tôi thu được trong nghiên cứu này. Kigawa và cs (2004) cho rằng thời điểm thích hợp nhất để cảm ứng biểu hiện endoglucanase chịu nhiệt từ *Clostridium thermocellum* là OD_{600} từ 0,8-1 [10], hay protein nội bào trong tế bào *E. coli* BL21 CP là $OD_{600} = 3$ sau 3-4 giờ nuôi [10].



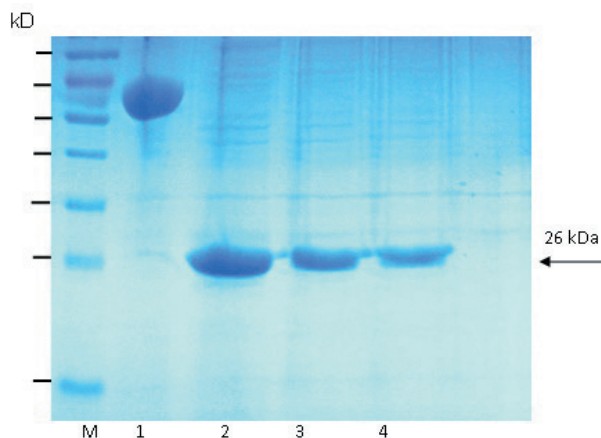
Hình 6. Ảnh hưởng của mật độ tế bào trước khi bổ sung chất cảm ứng

M là Marker protein (10 -170 kDa), *NC1*: *E. coli* không mang vector tái tổ hợp sinh trưởng ở 37°C trên môi trường LB; *NC2*: *E. coli* mang vector tái tổ hợp không bổ sung chất cảm ứng bằng IPTG sinh trưởng ở 37°C trên môi trường LB, 0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0 và 3,0 là mật độ tế bào trước khi bổ sung chất cảm ứng.

3.10. Tinh sạch và định lượng kháng nguyên tái tổ hợp 3-1E

Sau khi đã xác định được điều kiện nuôi cấy và biểu hiện tối ưu, chúng tôi tiến hành nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* BL21 tái tổ hợp trong 400 ml môi trường YJ có bổ sung kanamycin (50 µg/ml), nhiệt độ nuôi cấy 37°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút, khi mật độ tế bào vi khuẩn đạt $OD_{600} = 0,8$ thì tiến hành cảm ứng với 0,8 mM IPTG, nuôi lắc 200 vòng/phút ở 20°C trong thời

gian 10 giờ. Dịch thu được sau khi phá vỡ tế bào có chứa kháng nguyên tái tổ hợp 3-1E cho đi qua gel ProBond™ Purification System kit (Invitrogen, USA). Kết quả điện di cho thấy xuất hiện một băng protein với nồng độ cao ở vị trí khoảng 26 kDa, đúng bằng kích thước của protein dung hợp 6xHis-3-1E sau khi thăm dò biểu hiện (Hình 7). Vì vậy, có thể khẳng định gen 3-1E đã được biểu hiện thành công và đặc hiệu. Protein dung hợp 6xHis- 3-1E thu được có nồng độ tương đương 2000 µg/ml (Hình 7).



Hình 7. Kháng nguyên 3-1E thu được sau tinh sạch bằng gel ProBond™ Nickel-Chelating Resin

M: là khối lượng protein chuẩn (10 - 170 kDa); *1*: albumin (2000 µg/mL); *2*; *3* và *4*: Kháng nguyên 3-1E thu được sau khi ly giải ra khỏi gel tương ứng lần *1*; *2* và *3*.

IV. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tối ưu hóa được quy trình sản xuất kháng nguyên tái tổ hợp 3-1E ở quy mô phòng thí nghiệm. Môi trường nuôi cấy LB cho khả năng sinh trưởng tốt nhất với tỷ lệ tiếp giống 2% ($OD_{600} = 0,8$), lắc 200 vòng/phút ở 37°C sau 11 giờ nuôi cấy. Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của protein dung hợp 6xHis-3-1E lại cho kết quả tốt nhất trên môi trường YJ trong cùng một điều kiện tối ưu (nồng độ chất cảm ứng IPTG 0,8 mM, nuôi lắc ở 200 vòng/phút, nhiệt độ cảm ứng 20°C trong thời gian 10 giờ). Sắc ký lọc gel 6xHis cho thấy sản phẩm protein dung hợp 6xHis-3-1E có khối lượng phân tử khoảng 26 kDa.

* Đây là kết quả của đề tài nghiên cứu khoa học cấp Tỉnh, được ngân sách nhà nước tỉnh Thừa Thiên - Huế đầu tư.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đinh Thị Bích Lân, Phùng Thăng Long, Nguyễn Hoàng Lộc, Hoàng Tấn Quảng, Trần Thúy Lan, Lê Quốc Việt, Đặng Thanh Long, Lê Công Thịnh, Huỳnh Văn Chương, Đặng Thị Thu Giang (2014). Cải thiện mức độ biểu hiện kháng nguyên tái tổ hợp *Cryptosporidium parvum* Cp23 trong *E. coli* BL21 (DE3). *Khoa học kỹ thuật Thú y, tập XXI (6)*, pp. 35-42
- Nguyễn Hoàng Lộc, Nguyễn Thị Khánh Quỳnh, Hoàng Tấn Quảng, Trần Thúy Lan, Lê Mỹ Tiểu Ngọc, Đinh Thị Bích Lân, Phùng Thăng Long (2014). Nghiên cứu cải thiện mức độ biểu hiện của kháng nguyên bám dính K88 tái tổ hợp phân lập từ *Escherichia coli* mang độc tố đường ruột của lợn con cai sữa. *Tạp chí sinh học*, 36 (1se): 120-125.
- Ellis C.C (1986). Studies of the Vaibitily of the Oocyst of *Eimeria tenella*, with particular reference to condition of incubation. *Cornell Vet* 28, page 267.
- Kigawa T., Yabuki T., Matsuda N., Matsuda T., Nakajima R., Tanaka A., Yokoyama S. (2004), "Preparation of *Escherichia coli* cell extract for highly productive cell-free protein expression", *Journal of Structural and Functional Genomics*, 5, pp. 63-68.
- Lillehoj H.S., Choi K.D., Jenkins M.C., Vakharia V.N., Song K.D., Han J.Y., Lillehoj E.P. (2000), "A recombinant *Eimeria* protein inducing interferon-gamma production: comparison of different gen expression systems and immunization strategies for vaccination against coccidiosis", *Avian Dis*, 44(2), pp. 379-389.
- Ma D., Ma C., Pan L., Li G., Yang J., Hong J., Cai H., Ren X. (2011), "Vaccination of chickens with DNA vacxin encoding *Eimeria acervulina* 3-1E and chicken IL-15 offers protection against homologous challenge", *Experimental Parasitology*, 127(1), pp. 208-214.
- 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 gen molecular biotechnology*, 10, pp. 124-129.
- Xu J., Li W., Wu J., Zhang Y., Zhu Z., Liu J., Hu Z. (2006), "Stability of plasmid and expression of a recombinant gonadotropin-releasing hormone (GnRH) vacxin in *Escherichia coli*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, pp. 780-788.
- Zhang D.F., Xu H., Sun B.B., Li J.Q., Zhou Q.J., Zhang H.L., Du A.F. (2012), "Adjuvant Zhang Y., Wang L., Yao P., Zhang J., An J. (2013), "Expression and purification of 3-1E gen from *Eimeria acervulina* in *Pichia pastoris*", *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(11), pp. 659-665.
- Zhao Y., Wang C., Lu Y., Amer S., Xu P., Wang J., Lu J., Bao Y., Deng B., He H., Qin J. (2011), "Prokaryotic expression and identification of 3-1E gen of merozoite surface antigen of *Eimeria acervulina*", *Parasitology Research*, 109(5), pp. 1361-1365.

Nhận ngày 7-8-2015

Phản biện ngày 12-10-2015