



TẠO PEPTIDE ĐẦU C BẮM ĐỊNH HƯỚNG POLYSTYRENE VÀ THỬ KHẢ NĂNG BẮM

Đỗ Bá Quốc Thái, Lê Thanh Nguyên và Trần Văn Hiếu*

Phòng thí nghiệm Cảm biến Sinh học, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Văn Hiếu (email: tvhieus@hcmus.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 10/05/2022

Ngày nhận bài sửa: 21/06/2022

Ngày duyệt đăng: 16/07/2022

Title:

Cloning C-terminal polystyrene binding peptide fused protein A and its binding

Từ khóa:

Cố định kháng thể, protein cầu nối, protein PS-Ax1, xét nghiệm miễn dịch sử dụng pha rắn

Keywords:

Adapter protein, antibody immobilization, protein PS-Ax1, solid phase immunosorbent tests

ABSTRACT

Solid phase activation by the immobilization of antibodies onto material surface is the primary step in designing and developing solid phase immunosorbent tests. However, the present immobilization techniques: passive absorption, covalent coupling, and affinity immobilization are not completely efficient because of having many backlog problems which are randomly immobilization of antibodies, storage time, efficacy, interceding into the antibody structure, especially high production expense. Therefore, this study focused on designing protein PS-Ax1 which worked as an adapter protein helping to orientate antibodies onto polystyrene surface and the initial determination of binding capacity between PS-Ax1 and polystyrene. This study created a premise for studying and developing other solid phase immunosorbent kits.

TÓM TẮT

Hoạt hóa pha rắn thông qua việc cố định kháng thể lên trên bề mặt của chúng là bước đầu trong việc thiết kế và phát triển các kỹ thuật xét nghiệm miễn dịch dựa trên pha rắn. Tuy nhiên, các kỹ thuật được sử dụng để cố định kháng thể như hấp thụ động, cố định thông qua liên kết cộng hóa trị và liên kết ái lực chưa thực sự hiệu quả do còn tồn đọng nhiều nhược điểm như: sự gắn kết ngẫu nhiên trên của kháng thể, thời gian bảo quản, hiệu suất, cần can thiệp đến cấu trúc của kháng thể, đặc biệt là chi phí sản xuất cao. Vì vậy, trong nghiên cứu này, protein PS-Ax1 đóng vai trò như protein cầu nối giúp định hướng kháng thể trên bề mặt polystyrene và bước đầu xác nhận khả năng tương tác của protein mục tiêu với bề mặt vật liệu polystyrene. Kết quả này tạo tiền đề cho việc nghiên cứu phát triển các kit xét nghiệm miễn dịch khác.

1. GIỚI THIỆU

Các kỹ thuật xét nghiệm miễn dịch sử dụng pha rắn (Solid-phase Immunosorbent Tests – SPITs) ra đời mang lại tiềm năng lớn trong việc phát hiện bệnh trên người và động vật. Các kỹ thuật SPIT thông dụng có thể kể đến như: ELISA, xét nghiệm ngưng kết huyết thanh, xét nghiệm dòng chảy bên, ... Bước

đầu để thiết kế cũng như phát triển các kỹ thuật trên là dựa trên sự tương tác đặc hiệu giữa các kháng nguyên và kháng thể đặc hiệu cho kháng nguyên đó được cố định trên pha rắn. Với sự phát triển của các kỹ thuật sinh học, chúng ta đã có thể chủ động thu nhận được nhiều loại kháng thể, cả đơn dòng và đa dòng, thông qua nhiều hệ thống thu nhận như chuột, thỏ (Weber et al., 2017). Đặc biệt, với công nghệ

protein tái tổ hợp, nhiều loại kháng thể đã được cải biến, như kháng thể chuỗi đơn scFv, mảnh kháng thể Fab,... để phù hợp với nhiều mục đích sử dụng khác nhau (Kumada, 2014). Bên cạnh đó, việc cải biến và sản xuất các kháng thể tái tổ hợp thông qua các hệ thống biểu hiện như *E. coli*, nấm men giúp giảm thiểu giá thành sản phẩm và thời gian sản xuất (Verma et al., 1998). Tuy nhiên, độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật xét nghiệm dựa trên pha rắn phụ thuộc lớn vào loại pha rắn, loại kháng thể, cơ chất phản ứng và đặc biệt là sự định hướng của kháng thể bề mặt vật liệu, thông thường là polystyrene. Nhìn chung, khả năng liên kết kháng nguyên của kháng thể phụ thuộc chủ yếu vào cấu trúc của chúng sau khi được gắn lên pha rắn với ba cấu trúc chính: i) ends-on (đuôi Fc gắn với bề mặt vật liệu); ii) side-on (các mặt bên của kháng thể gắn với bề mặt vật liệu); và iii) top-on (vùng Fab của kháng thể gắn với bề mặt vật liệu).

Hiện nay, các chiến lược cố định kháng thể lên pha rắn thường được sử dụng: hấp thụ thụ động, cố định bằng liên kết cộng hóa trị và liên kết ái lực. Đầu tiên, hấp thụ thụ động cho thấy hiệu quả cao khi tận dụng các đặc tính của kháng thể - vùng Fc mang tính kỵ nước có kích thước lớn - giúp chúng có thể dễ dàng cố định lên trên bề mặt vật liệu polystyrene thông qua tương tác kỵ nước (Norde & Lyklema, 1978). Tuy nhiên, đây là kỹ thuật cố định kháng thể một cách ngẫu nhiên, dẫn đến việc kháng thể được cố định sẽ mang nhiều cấu trúc khác nhau, dẫn đến giảm thiểu độ nhạy của xét nghiệm do không xoay định hướng vùng Fab liên kết kháng nguyên hoặc vùng Fab này bị che phủ do tạo nên sự đa lớp kháng thể trên bề mặt hạt (Jódar-Reyes et al., 2005). Một nhược điểm đáng chú ý khác là việc hấp thụ thụ động chỉ giúp cố định kháng thể lên bề mặt vật liệu trong một thời gian ngắn và có thể mất sự cố định dưới tác động của các lực vật lý (Ortega-Vinuesa et al., 1996). Do đó, cố định kháng thể bằng liên kết cộng hóa trị là giải pháp thay thế để giải quyết vấn đề trên. Tuy nhiên, việc tạo liên kết hóa học giữa bề mặt vật liệu với kháng thể có bản chất là protein thông qua các linker hóa học có thể gây ảnh hưởng trực tiếp đến cấu trúc và chức năng của kháng thể, cũng như hiệu suất thấp do các góc phản ứng có khả năng tạo liên kết trên bề mặt vật liệu, đơn cử là hạt latex chỉ chiếm ~10% so với tổng diện tích bề mặt (Chan et al., 2007). Việc cố định thông qua liên kết cộng hóa trị cũng làm tăng giá thành sản phẩm cũng như quy trình thực hiện phức tạp do cần phải xử lý hạt để loại bỏ các linker và góc hóa học trên bề mặt chưa được liên kết với kháng thể. Cuối cùng, liên kết kháng thể với bề mặt hạt latex thông qua liên kết

ái lực giữa Biotin-Streptavidin cho thấy hiệu quả cao hơn hẳn hai kỹ thuật trên. Mặc dù phương pháp này có khả năng định hướng kháng thể cao cũng như liên kết bền vững nhưng việc tiền xử lý kháng thể yêu cầu kỹ thuật phức tạp, giá thành cao cũng như gây ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của kháng thể (Chivers et al., 2011).

Vì vậy, trong bài viết này, thiết kế một protein dung hợp giữa tiểu phần protein A và đuôi peptide có ái lực cao với bề mặt vật liệu polystyrene đã được nghiên cứu. Protein Ax1 được thu nhận từ vi khuẩn *Staphylococcus aureus* có khả năng liên kết đặc hiệu với đuôi Fc của kháng thể qua đó giúp xoay định hướng vùng Fab ra ngoài bề mặt vật liệu; trong khi đó, đuôi peptide có ái lực cao với bề mặt vật liệu polystyrene giúp protein dung hợp có thể năng liên kết chặt chẽ với vật liệu polystyrene (Tang et al., 2003; Kumada et al., 2021). Việc phủ bề mặt vật liệu bằng protein dung hợp PS-Ax1 cho thấy tiềm năng cao trong việc giải quyết các vấn đề còn tồn đọng trong SPITs. Bên cạnh đó, nghiên cứu này cũng bước đầu xác định khả năng liên kết với polystyrene của protein dung hợp.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chủng chủ và plasmid

Vector tái tổ hợp được nhân bản thông qua hệ thống *E. coli* DH5 α và chủng *E. coli* BL21 (DE3) được sử dụng làm hệ thống biểu hiện protein mục tiêu. Plasmid pET22-*ax1* (GMIF0277) chứa gen mã hóa cho protein Ax1 được sử dụng làm khuôn thu nhận gene mục tiêu. Plasmid pET22b được sử dụng để dòng hóa cũng như biểu hiện gene *ps-ax1* dưới sự kiểm soát của promoter T7 thông qua việc cảm ứng với IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). Tất cả các chủng vi sinh vật và plasmid được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Cảm biến sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Cấu trúc vector tái tổ hợp pET22b-*ps-ax1*

Gen mục tiêu *ps-ax1* được thu nhận từ khuôn pET22-*ax1* bằng kỹ thuật overlap extension PCR với cặp mồi đặc hiệu 216F *NdeI* và 480R *HindIII*. Sau khi thu nhận, gen *pro-ax1* được thêm vào đoạn trình tự có khả năng mã hóa cho peptide có ái lực cao với vật liệu polystyrene ở đầu C nhờ vào trình tự của mồi 480R *HindIII*. Sau khi đã thu nhận thành công, cả gen mục tiêu *ps-ax1* và plasmid pET22b được xử lý với cặp enzyme cắt giới hạn *NdeI* và *HindIII* và nối lại với nhau nhờ enzyme T4 ligase. Sản phẩm nối được biến nạp vào chủng *E. coli* DH5 α và được nuôi cấy trên đĩa LB có chứa kháng

sinh Ampicillin. Các khuẩn lạc tăng sinh trên đĩa sẽ được chọn ngẫu nhiên để sàng lọc dòng mang vector tái tổ hợp bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc với cặp mồi T7pro và T7ter (mồi trên plasmid pET22b).

2.3. Tạo dòng chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET22b-*ps-ax1*

Vector tái tổ hợp được thu nhận sau khi nhân bản bằng chủng *E. coli* DH5 α và được hóa biến nạp vào chủng *E. coli* BL21 (DE3). Sau khi được biến nạp và nuôi cấy trên môi trường LB-agar, các khuẩn lạc *E. coli* BL21 (DE3) sẽ được sàng lọc dòng mang vector tái tổ hợp pET22b-*ps-ax1* thông qua kỹ thuật PCR khuẩn lạc với cặp mồi trên plasmid T7pro và T7ter.

2.4. Cầm ứng biểu hiện protein tái tổ hợp PS-Ax1

Chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET22b-*ps-ax1* được nuôi cấy lắc trong ống môi trường LB có chứa Ampicillin ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 16 giờ. Sau đó, vi khuẩn được cấy chuyển với tỉ lệ 1:10 (v/v) và tiếp tục nuôi cấy lắc ở nhiệt độ 37°C cho đến khi OD₆₀₀ đạt giá trị 0,6-0,8. Ngay sau đó, chất IPTG được bổ sung vào môi trường ở nồng độ cuối là 0,5 mM và tiếp tục nuôi cấy lắc ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 4 giờ. Sau khi kết thúc thời gian nuôi cấy, sinh khối vi khuẩn được thu nhận và ly giải bằng sóng siêu âm để thu protein ở các pha tổng, tan và tủa. Sự biểu hiện protein mục tiêu ở các pha sẽ được đánh giá bằng phương pháp SDS-PAGE với nhuộm Coomassie và Western Blot với kháng thể 6xHis. Thực hiện đồng thời với mẫu đối chứng là dịch mẫu pha tổng của *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*ps-ax1* không cảm ứng IPTG.

2.5. Đánh giá khả năng tương tác của protein tái tổ hợp với bề mặt vật liệu polystyrene

Hạt latex DSCR001 0,050 μ m 5% (Bangs Laboratoty, Inc.) được sử dụng làm pha rắn trong thử nghiệm này. Đầu tiên, 50 μ L hạt latex được tiến hành rửa với 100 μ L PBS pH 7,4 ba lần bằng cách ly tâm ở 10.000 rpm, 15 phút, 4°C. Tiếp theo, hạt latex sau khi rửa được ủ với dịch phá tế bào ở pha tan của *E. coli* BL21 (DE3)/pET22b-*ps-ax1* sao cho tỉ lệ pha rắn cuối cùng của hỗn hợp là 1% trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 4 °C. Sau khi ủ, tiến hành ly tâm, thu cặn hạt và loại dịch nổi chứa protein không bám hạt. Cặn hạt sẽ được tiến hành rửa lại với PBS pH 7,4 ba lần. Cuối cùng, các protein bám trên hạt sẽ được ly giải dưới tác động biến tính của dịch nạp

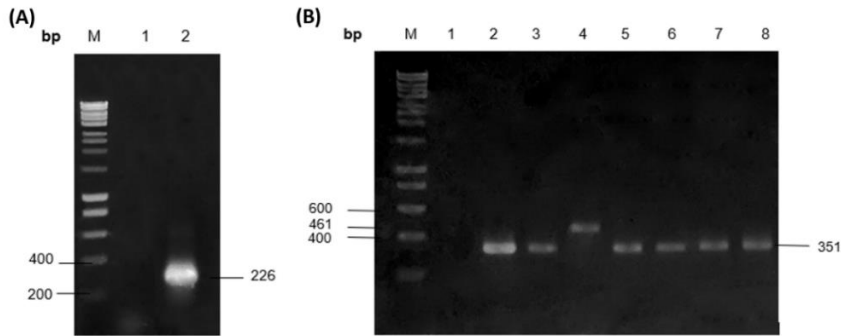
mẫu (DTT 0,6M, SDS 12%) và nhiệt độ. Khả năng bám hạt latex của protein tái tổ hợp PS-Ax1 sẽ được đánh giá bằng phương pháp điện di protein Tricine-SDS-PAGE và nhuộm bạc các dịch trước bám, dịch nổi, dịch rửa hạt, và dịch ly giải.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo dòng chủng *E. Coli* DH5 α mang vector tái tổ hợp pET22b-*ps-ax1*

Gen mục tiêu *ps-ax1* được thu nhận từ khuôn pET22-*ax1* thông qua kỹ thuật overlap extension PCR với cặp mồi đặc hiệu 216F *NdeI* và 480R *HindIII*. Sản phẩm PCR được kiểm tra kích thước bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,5%. Kết quả phân tích cho thấy đã thu nhận được duy nhất một đoạn gene có kích thước 226 bp, tương ứng với kích thước dự đoán của gene *ps-ax1* (giếng 2, Hình 1A). Bên cạnh đó, chứng âm của phản ứng PCR được tiến hành với các thành phần tương tự như phản ứng thu gene nhưng không bổ sung khuôn pET22-*ax1* nhằm kiểm tra sự ngoại nhiễm. Kết quả cho thấy không có sự hiện diện của bất kì vạch DNA nào chứng tỏ phản ứng PCR thu nhận Gen hoàn toàn không có tác nhân ngoại nhiễm (giếng 1, Hình 1A).

Sau đó, gene *ps-ax1* và plasmid pET22b cùng được xử lý tạo đầu dính bằng cặp enzyme cắt giới hạn *NdeI* và *HindIII*. Gene và plasmid sau khi cắt sẽ được nối với nhau thông qua enzyme T4 ligase và tiến hành biến nạp sản phẩm nối vào chủng *E. coli* DH5 α . Plasmid pET22b mang gene kháng kháng sinh Ampicillin hỗ trợ sàng lọc thể biến nạp bước đầu trên môi trường nuôi cấy có chứa kháng sinh Ampicillin. Các khuẩn lạc dự tuyển này tiếp tục được sàng lọc bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc với cặp mồi T7pro và T7ter. Các khuẩn lạc mọc trên đĩa LB Amp100 được chọn ngẫu nhiên để sàng lọc dòng mang vector tái tổ hợp bằng phương pháp PCR khuẩn lạc với cặp mồi trên plasmid T7pro/T7ter. Chứng âm gồm các thành phần của phản ứng PCR nhưng không mang khuôn để kiểm tra độ tin cậy của điều kiện thí nghiệm. Đối chứng dương là sản phẩm của phản ứng PCR với khuôn là plasmid pET22b, được thực hiện để so sánh sự chênh lệch về kích thước với trường hợp PCR của vector đã được chèn thêm gen. Trong các khuẩn lạc được chọn để sàng lọc, khuẩn lạc dự tuyển số 2 (giếng 4, Hình 1B) cho sản phẩm PCR có kích thước ~461 bp, lớn hơn so với đối chứng mang vector không chèn gen (~351 bp) (giếng 2, Hình 1B). Từ kết quả này cho thấy, plasmid tái tổ hợp pET22b-*ps-ax1* đã được tạo thành công.



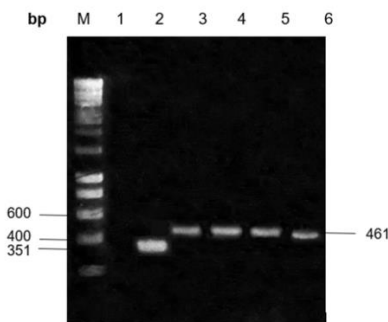
Hình 1. Thu nhận gene *ps-ax1*

(A). M: Thang chuẩn DNA 1000bp; 1: Chứng âm; 2: Sản phẩm PCR thu gene *ps-ax1* và Sàng lọc thể biến nạp *E. coli* DH5α bằng cặp môi T7pro và T7ter; (B). M: Thang chuẩn 1000 bp; 1: Chứng âm; 2: Chứng dương plasmid pET22b; 3-8: Các khuẩn lạc dự tuyển.

3.2. Tạo dòng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET22b-*ps-ax1*

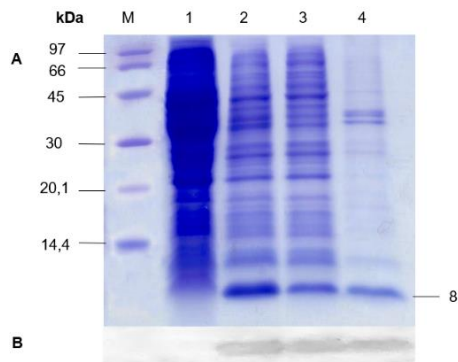
Vector tái tổ hợp σET22b-*ps-ax1* được nhân bản và thu nhận từ chủng *E. coli* DH5α sẽ được tiến hành hóa biến nạp kết hợp với sốc nhiệt vào tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3).

Sau khi nuôi cấy trên môi trường LB chứa Ampicillin, các khuẩn lạc có khả năng tăng sinh trên đĩa sẽ được chọn ngẫu nhiên để sàng lọc dòng mang vector mục tiêu bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc với cặp môi T7pro và T7ter. Kết quả điện di cho thấy các khuẩn lạc *E. coli* BL21(DE3) dự tuyển đều có sản phẩm PCR khuẩn lạc có kích thước 461 bp (giếng 3-6, Hình 2), lớn hơn so với sản phẩm PCR của plasmid pET22b (351 bp) (giếng 2, Hình 2). Như vậy, có thể kết luận đã biến nạp thành công plasmid tái tổ hợp pET22b-*ps-ax1* vào chủng *E. coli* BL21(DE3). Chủng vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*ps-ax1* sau đó được cảm ứng biểu hiện protein mục tiêu bằng IPTG dùng làm nguyên liệu cho các thí nghiệm kế tiếp.



Hình 2. Sàng lọc khuẩn lạc *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp với cặp môi T7pro/T7ter

M: Thang chuẩn 1000 bp; 1: Chứng âm; 2: Chứng dương pET22b; 3-6: Các khuẩn lạc dự tuyển.



Hình 3. Kiểm tra sự biểu hiện của protein PS-Ax1 bằng điện di Tricine-SDS-PAGE (A) và lai Western với kháng thể kháng 6xHis (B).

M: Thang phân tử lượng protein; 1: *E. coli* BL21 (DE3)/pET22b-*ps-ax1*, IPTG (-); 2-4: *E. coli* BL21 (DE3)/pET22b-*ps-ax1*, IPTG (+); 2: pha tổng; 3: pha tan; 4: pha tủa.

3.3. Kiểm tra sự biểu hiện của protein PS-Ax1

Sau khi được biến nạp thành công, chủng biểu hiện *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*ps-ax1* được hoạt hóa, cấy chuyển và cảm ứng biểu hiện với IPTG 0,5 mM trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ 37 °C. Đối chứng âm là chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*ps-ax1* không cảm ứng IPTG, được tiến hành song song.

Kết quả điện di protein Tricine-SDS-PAGE và nhuộm Coomassie cho thấy mẫu đối chứng âm không xuất hiện vạch protein biểu hiện vượt mức và tương ứng với kích thước dự đoán của protein mục tiêu là xấp xỉ 8 kDa (giếng 1, Hình 3A). Điều này cho thấy không có sự rò rỉ biểu hiện của protein PS-Ax1. Trong khi đó, mẫu khảo sát là chủng *E. coli*

BL21(DE3)/pET22b-*ps-ax1* có xuất hiện vạch protein được biểu hiện vượt mức và tương ứng với kích thước dự đoán (giếng 2, Hình 3A). Kết quả kiểm tra cho thấy protein PS-Ax1C được biểu hiện ở cả hai pha tan và tủa với lượng gần như tương đương nhau (giếng 3 và 4, Hình 3A). Phương pháp Western Blot được sử dụng để xác nhận sự biểu hiện của protein PS-Ax1. Kết quả lai hiển thị tại giếng 2, 3, 4, Hình 3B cho tín hiệu phát màu trên màng lai tương ứng với vị trí của protein trên gel polyacrymide, trong khi đó chứng âm không có tín hiệu. Do đó, có thể dự đoán rằng các vạch tín hiệu này là protein mục tiêu PS-Ax1.

Từ những kết quả trên có thể kết luận rằng, protein PS-Ax1C đã được biểu hiện thành công.

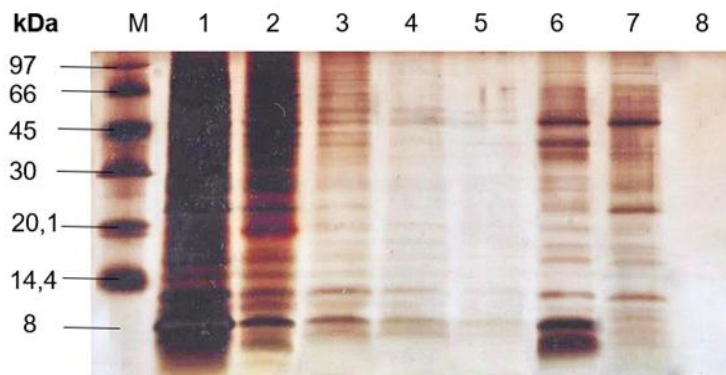
3.4. Thử nghiệm khả năng bám hạt latex của protein PS-Ax1

Protein mục tiêu PS-Ax1 được biểu hiện và thu nhận dưới dạng tan sẽ được tiến hành ủ bám với hạt latex. Sau khi đã ủ, dịch nổi và dịch rửa hạt được thu lại để tiến hành đánh giá gián tiếp khả năng gắn hạt của protein. Cuối cùng, các protein gắn hạt sẽ bị biến tính dưới tác động của nhiệt và các chất gây biến tính như DTT có trong dung dịch nạp mẫu. Dịch dung ly thu được chứa các protein gắn hạt đã bị biến tính và được điện di phân tách bằng phương pháp Tricine-SDS-PAGE.

Kết quả điện di kiểm tra khả năng gắn hạt protein PS-Ax1 cho thấy có vạch đậm tương ứng với kích thước dự đoán của protein mục tiêu là 8 kDa sau khi tiến hành biến tính các protein bám hạt (giếng 6, Hình 4). Trong khi đó, đối chứng âm là dịch phá tế bào ở pha tan của chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET22b (IPTG-) không cho thấy bất kỳ vạch protein biểu

hiện vượt mức nào tương ứng với kích thước mục tiêu (giếng 7, Hình 4). Dịch rửa hạt ở các lần 1, 2 và 3 đều cho thấy có một phần protein PS-Ax1 bị rửa trôi, kèm theo đó là các protein tạp nhiễm khác (giếng 3, 4, 5, Hình 4). Kết quả điện di kiểm tra cũng cho thấy hiệu suất gắn hạt của protein PS-Ax1 là đáng kể khi dịch nổi chứa lượng protein PS-Ax1 chưa bám ở lượng thấp, cùng với đó là khả năng tương tác mạnh với hạt nên chỉ một lượng ít protein PS-Ax1 bị rửa trôi. Cuối cùng, hạt latex được chứng minh là sạch khi không gắn bất kỳ protein mục tiêu hoặc tạp nhiễm nào khác (giếng 8, Hình 4). Như vậy, bước đầu đã xác định được khả năng tương tác giữa protein PS-Ax1 thông qua đuôi peptide dung hợp.

Việc sử dụng các peptide ái lực trong cố định kháng thể lên bề mặt pha rắn đang được nghiên cứu rộng rãi. Các nghiên cứu của Kumada et al. (2010, 2014, 2015) đã cho thấy việc dung hợp các peptide ngắn từ 8-12 amino acid với các kháng thể/mảnh kháng thể có thể giúp chúng cải thiện được khả năng tương tác cũng như định hướng trên bề mặt pha rắn, qua đó giúp cải thiện được độ nhạy cũng như hiệu quả của các xét nghiệm lai miễn dịch. Tuy nhiên, việc dung hợp trực tiếp peptide với kháng thể đòi hỏi phải cải biến, tạo loại kháng thể dung hợp mới mỗi khi thay đổi loại kháng nguyên cần nhận biết. Do đó, trong nghiên cứu này, việc tạo ra protein Ax1 được dung hợp với đuôi peptide có ái lực cao với bề mặt polystyrene như một giải pháp mang tính toàn năng hơn. Bên cạnh đó, việc sử dụng protein Ax1 dung hợp với đuôi peptide không chỉ được thử nghiệm, phát triển đối với vật liệu polystyrene mà còn được phát triển trên các loại vật liệu khác, đơn cử như nitrocellulose (Thao-Suong et al., 2021).



Hình 4. Đánh giá khả năng bám hạt của protein PS-Ax1 bằng phương pháp điện di Tricine-SDS-PAGE và nhuộm bạc

M: thang phân tử lượng protein; 1: dịch protein trước khi ủ; 2: dịch nổi protein sau khi ủ; 3: dịch rửa lần 1; 4: dịch rửa lần 2; 5: dịch rửa lần 3; 6: dịch dung ly hạt ủ với dịch protein mẫu; 7: dịch dung ly hạt ủ với dịch protein chứng âm, 8: dịch dung ly hạt không ủ.

4. KẾT LUẬN

Vector tái tổ hợp mang gen *ps-ax1* mã hóa cho protein PS-Ax1 được cấu trúc thành công; dòng hóa thành công chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang plasmid tái tổ hợp và biểu hiện thành công protein PS-Ax1. Trong nghiên cứu trên, khả năng tương tác của

protein PS-Ax1 với bề mặt hạt latex có bản chất là polystyrene bước đầu đã được xác nhận. Nghiên cứu này làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo trong việc phát triển các kit xét nghiệm miễn dịch yêu cầu sự cố định và định hướng của kháng thể trên bề mặt vật liệu polystyrene.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Weber, J., Peng, H., & Rader, C. (2017). From rabbit antibody repertoires to rabbit monoclonal antibodies. *Experimental & molecular medicine*, 49(3), e305. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.23>
- Chan, L., Cross, H., She, J. K., Cavalli, G., Martins, H. F. P., & Neylon, C. (2007). Covalent Attachment of Proteins to Solid Supports and Surfaces via Sortase-Mediated Ligation. *PLOS ONE*, 2(11), e1164. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001164>
- Chivers, E. C., Apurba, L. K., Edward, D. L., & Mark, H. (2011). How the biotin-streptavidin interaction was made even stronger: investigation via crystallography and a chimaeric tetramer. *The Biochemical journal*, 435(1), 55–63. <https://doi.org/10.1042/BJ20101593>
- Tang, J. B., Sun, X. F., Yang, H. M., Zhang, B. G., Li, Z. J., Lin, Z. J., & Gao, Z. Q. (2013). Well-oriented ZZ-PS-tag with high Fc-binding onto polystyrene surface for controlled immobilization of capture antibodies. *Analytica Chimica acta*, 776, 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.03.017>
- Jódar-Reyes, A. B., Ortega-Vinuesa, J. L., & Martín-Rodríguez, A. (2005). Adsorption of different amphiphilic molecules onto polystyrene latices. *J. Colloid Interface Sci.*, 282(2), 439–447. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.08.183>
- Kumada, Y. (2014). Site-specific immobilization of recombinant antibody fragments through material-binding peptides for the sensitive detection of antigens in enzyme immunoassays. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1844(11), 1960–1969. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.07.007>
- Kumada, Y., Shiritani, Y., Hamasaki, K., Nakagawa, A., Sasaki, E., & Kishimoto, M. (2010). Novel solid-phase refolding method for preparation of scFv-immobilized polystyrene plates with high-antigen-binding activity. *Anal. Bioanal. Chem.*, 398(3), 1295–1303. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4035-7>
- Kumada, Y., Ishikawa, Y., Fujiwara, Y., Takeda, R., Miyamoto, R., Daisuke, N., Momosa, S., Kang, B., & Kishimoto, M. (2014). Efficient refolding and immobilization of PMMA-tag-fused single-chain Fv antibodies for sensitive immunological detection on a PMMA plate. *J. Immunol. Methods*, 411, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.05.015>
- Kumada, Y., Kang, B., Yamakawa, K., Kishimoto, M., & Horiuchi, J. I. (2015). Efficient preparation and site-directed immobilization of VHH antibodies by genetic fusion of poly(methylmethacrylate)-binding peptide (PMMA-Tag). *Biotechnol. Prog.*, 31(6), 1563–1570. <https://doi.org/10.1002/btpr.2169>
- Kumada, Y., Miyamura, Y., Tanibata, R., Takahashi, K., Ogasawara, S., Gondaira, F., & Horiuchi, J. I. (2021). Design and site-directed immobilization of single-chain Fv antibody to polystyrene latex beads via material-binding peptides and application to latex turbidimetric assay. *Journal of bioscience and bioengineering*, 131(1), 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.08.014>
- Norde, W., & Lyklema, J. (1978). The adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at negatively charged polystyrene surfaces: I. Adsorption isotherms. Effects of charge, ionic strength, and temperature. *J. Colloid Interface Sci.*, 66(2), 257–265. [https://doi.org/10.1016/00219797\(78\)90303-X](https://doi.org/10.1016/00219797(78)90303-X)
- Ortega-Vinuesa, J. L., Bastos-González, D., & Hidalgo-Álvarez, R. (1996). Effect of Storage Time on the Immunoreactivity of IgG Physically Adsorbed or Chemically Bound to Latex Beads. *J. Colloid Interface Sci.*, 184(1), 331–334. <https://doi.org/10.1006/jcis.1996.0627>
- Thao-Suong, T. N., Dang-Thuc, L. N., Khai-Hoan, N. P., Thuoc, T. L., & Hieu, T. V. (2021). Simultaneously targeting nitrocellulose and antibody by a dual-headed protein. *Protein Expression and Purification*, 177, 105764. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105764>
- Verma, R., Boleti, E., & George, A.J. (1998). Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *J Immunol Methods*, 216, 165-181. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(98\)00077-5](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(98)00077-5)