

BIỂU HIỆN, TÍNH SẠCH β -SUBUNIT CỦA F₀F₁-ATPase VÀ TẠO KHÁNG THỂ KHÁNG β -SUBUNIT TÀI TỔ HỢP

Nguyễn Thị Hoa¹, Đồng Văn Quyền¹, Vũ Thị Hiền¹, Nguyễn Thanh Tùng¹, Lê Phương Hằng¹, Nguyễn Quang Liêm², Đinh Duy Kháng¹

¹Viện Công nghệ sinh học

²Viện Khoa học vật liệu

TÓM TẮT

Các đợt dịch mới bùng phát trên toàn thế giới gần đây gây ra bởi virus đã nhấn mạnh tầm quan trọng và tính cấp thiết của việc giám sát và nghiên cứu dịch tễ học phân tử của virus. Việc phát hiện nhanh, nhạy và đặc hiệu virus gây bệnh là chìa khóa quyết định khả năng thành công trong công tác phòng và chống bệnh. Nhiều phương pháp có thể được dùng để phát hiện virus, bao gồm xét nghiệm miễn dịch, phát hiện nucleic acid của virus bằng kính hiển vi điện tử truyền dẫn, PCR và thậm chí cả kính hiển vi quang học. Tuy nhiên, hầu hết các phương pháp này đều mất nhiều thời gian và đòi hỏi các mẫu xét nghiệm phải sạch. Vì lý do đó, các nhà nghiên cứu đang hướng tới áp dụng công nghệ nano để phát triển các nanosensor có độ nhạy cao, tăng khả năng phát hiện virus. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả biểu hiện tiểu phần β -subunit của F₀F₁-ATPase (Fabs) ở *E. coli* và sản xuất kháng thể kháng β -subunit tái tổ hợp (anti-Fabs), một "cấu phần" thiết yếu để phát triển biosensor dùng trong chẩn đoán các tác nhân gây bệnh. Đoạn gen mã hóa β -subunit được khuếch đại trực tiếp từ genomic DNA của *Bacillus* SP3 bằng PCR, tách dòng vào vector pCR2.1 và xác định trình tự. Đoạn gen này sau đó được thiết kế vào vector biểu hiện pET21a+ và biểu hiện trong *E. coli* chủng BL21(DE3). Fabs tái tổ hợp được tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực (ProbondTM Nickel-Chelating Resin) và sử dụng để sản xuất kháng thể bằng cách gây miễn dịch trên thỏ. Sau 5 ngày kể từ lần gây miễn dịch cuối cùng, huyết thanh được tách riêng từ máu thỏ, chia nhỏ vào các ống nghiệm và bảo quản ở -80°C. Lai Western cho thấy kháng thể anti-Fabs phản ứng đặc hiệu với β -subunit của F₀F₁-ATPase từ nhiên có trong chromatophore từ *Rhodospirillum rubrum*. Kháng thể này có thể được sử dụng để phát triển biosensor phát hiện các tác nhân gây bệnh.

Từ khóa: *Bacillus* SP3, β -subunit của F₀F₁-ATPase (Fabs), biểu hiện, kháng thể anti-Fabs, nhân dòng, *Rhodospirillum rubrum*, tinh sạch

ĐẶT VẤN ĐỀ

F₀F₁-ATPase là enzyme có tính bảo thủ cao được tìm thấy trong tất cả các sinh vật, xúc tác cho phản ứng tổng hợp ATP từ ADP và phosphate vô cơ nhờ năng lượng sinh ra từ sự chuyển động proton theo gradient trên màng trong vi khuẩn, lục lạp và ty thể. Giống như tất cả các F₀F₁-ATPase khác, enzyme có nguồn gốc từ *Escherichia coli* có cấu trúc rất bất đối xứng và có thể được chia thành hai phần là F₀ và F₁. Phần F₁ liên kết với màng mang các vị trí tương tác với nucleotide bao gồm các tiểu phần α , β , γ , δ và ϵ . Phần F₀ chứa các tiểu phần "lưu chuyển" proton qua màng và được cấu tạo từ các tiểu đơn vị a, b và c (Vik *et al.*, 2000; Angevine, Fillingame, 2003; Zhang, Vik, 2003).

Là một "động cơ" quay sinh học kích thước nano, có khả năng dẫn truyền năng lượng nên F₀F₁-ATPase có thể được ứng dụng trong công nghệ nano.

Cui *et al.* (2005) sử dụng f-DHPE (fluorescence-high density polylethylene) đánh dấu trên bề mặt chromatophore đã phát hiện được thông lượng proton chảy qua F₀F₁-ATPase gây ra bởi sự tổng hợp/thủy phân ATP. Kết quả nghiên cứu này mở ra triển vọng ứng dụng động cơ F₀F₁-ATPase như cảm biến sinh học (biosensor) để phát hiện các yếu tố gây bệnh ở mức độ phân tử.

F₀F₁-ATPase hoạt động như một cỗ máy phân tử hai chiều; khi proton chảy qua F₀, ATP sẽ được tổng hợp từ ADP và phosphate vô cơ trong F₁ nhờ nguồn năng lượng sinh ra bởi sự chuyển động của dòng proton, trong khi đó quá trình thủy phân ATP trong F₁ lại cung cấp năng lượng để bơm proton ngược trở lại qua F₀. Hai phản ứng đưa proton vào trong F₀ và thủy phân/tổng hợp ATP trong F₁ được giả định là kết hợp qua lại nhờ chuyển động xoay cơ học của động cơ F₀F₁-ATPase (Montemagno, Bachand, 1999; Liu *et al.*, 2002). Cả F₀ và F₁ đều là

‘động cơ’ quay, hoạt động của F0 được điều khiển bởi dòng proton và hoạt động của F1 được điều khiển bởi sự thủy phân ATP. Hai động cơ này dùng chung một trục quay, tuy nhiên chiều quay của chúng lại đối ngược nhau. Vì vậy khi dòng lực proton cao, F0 mạnh hơn F1. F1 quay theo chiều ngược với chiều gây ra bởi phản ứng thủy phân ATP. kết quả dẫn đến tổng hợp ATP. Khi F1 mạnh hơn F0, động cơ quay theo chiều ngược lại và proton chảy ngược lại

Liu và đồng tác giả (2006) đã nghiên cứu phát triển biosensor dựa trên F0F1-ATPase để phát hiện virus cúm. Nhóm tác giả gắn kháng thể kháng virus cúm (H9N1) với kháng thể kháng β -subunit thông qua “cầu nối” biotin-streptavidine. Phức hợp này sau đó được gắn với chromatophore tách chiết từ vi khuẩn tia *Rhodospirillum rubrum* đã gắn với mầu do huỳnh quang nhờ sự tương tác giữa kháng thể kháng β -subunit với β -subunit trong chromatophore tạo nên một sensor để phát hiện virus cúm. Nhiều tác giả khác cũng nghiên cứu ứng dụng động cơ F0F1-ATPase kết hợp với chấm lượng tử (quantum dot) và phát triển thành công biosensor phát hiện virus gây bệnh (Deng *et al.*; 2007, Lee *et al.*, 2009). Với mục đích phát triển một biosensor trên cơ sở F0F1-ATPase và chấm lượng tử, trong công trình này chúng tôi biểu hiện và tinh sạch tiểu phần β -subunit từ *Bacillus* SP3 và sử dụng protein tái tổ hợp tinh sạch gây miễn dịch cho thỏ để sản xuất kháng thể kháng β -subunit. Đây sẽ là nguyên liệu cho việc phát triển và hoàn thiện biosensor chẩn đoán virus cúm và các tác nhân gây bệnh khác.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi khuẩn và vector

Genomic DNA của chủng vi khuẩn *Bacillus* SP3 do giáo sư Hideo Akutsu tại Viện Nghiên cứu Protein, Đại học Osaka Nhật Bản cung cấp. Vector pCR2.1 (Invitrogen) và pET21a+ được sử dụng để tách dòng và biểu hiện gen mã hóa β -subunit của F0F1-ATPase (fabs) lần lượt ở *E. coli* DH5 α và BL21 (DE3). Protein tái tổ hợp (Fabs) biểu hiện ở hệ thống này được điều khiển bởi promoter T7 và gắn thêm đoạn trình tự 6 histidine giúp cho việc tinh sạch protein đích trở nên dễ dàng hơn nhờ sử dụng cột Ni-NTA có ái lực với histidine. Chủng vi khuẩn *Rhodospirillum rubrum* mua từ Home Science Tools, Mỹ.

Hóa chất

Taq polymerase, T4 ligase, X-gal, IPTG và

thang DNA 1 kb do Fermentas cung cấp. Các enzyme giới hạn *Nde*I và *Xho*I từ New England Biolabs. Kit tách chiết DNA từ Bioneer. ProBond™ Nickel-Chelating Resin từ Invitrogen. PCR Purification Kit từ QIAGEN. Màng PVDF từ Millipore. Sữa gầy (skim milk), complete freund's adjuvant, incomplete freund's adjuvant, cộng hợp kháng IgG thô gắn HRP từ Sigma.

Tách dòng và đọc trình tự

Đoạn gen mã hoá β -subunit của F0F1-ATPase được khuếch đại bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu: mồi xuôi (BetaF), 5'-TTC CAT ATG ACA TCG CGT GCG TTG G-3'; mồi ngược (BetaR), 5'-AAT CTC GAG GAC ACC CAT CGC TTT CG-3'. Để chèn sản phẩm PCR vào vector biểu hiện, vị trí cắt của 2 enzyme *Nde*I và *Xho*I được đưa vào đầu 5' tương ứng ở mỗi xuôi và mỗi ngược.

Hỗn hợp PCR gồm: 2 μ l DNA (50-100 ng), 2,5 μ l đệm taq, 1 μ l mồi xuôi, 1 μ l ngược, 2,5 μ l dNTP, 0,3 μ l Taq polymerase và 15,7 μ l H₂O. Chu trình nhiệt của PCR: 94°C/3', 30 chu kỳ (95°C/50", 55°C/40", 72°C/40"); 72°C/8'. Sản phẩm PCR *fabs* được tinh sạch bằng PCR Purification Kit (QIAGEN), được chèn vào vector pCR2.1 tạo ra pCFabs, biến nạp vào *E. coli* DH5 α như đã mô tả (Đồng Văn Quyên *et al.*, 2005), nuôi qua đêm trên đĩa môi trường LB chọn lọc bổ sung X-Gal và IPTG. Một số khuẩn lạc trắng được chọn ngẫu nhiên, nuôi lắc qua đêm trong môi trường LB lỏng bổ sung Amp, sau đó tách plasmid và chọn lọc các dòng mang đoạn gen β -subunit bằng phân tích enzyme giới hạn và xác định trình tự theo Sanger *et al.* (1997) trên máy ABI PRISM®3100 Genetic Analyzer. Dữ liệu được xử lý bằng phần mềm phân mềm Bioedit và BLAST.

Thiết kế plasmid biểu hiện pEFabs, biểu hiện và tinh sạch Fabs

fabs được cắt ra khỏi pCFabs bằng *Nde*I và *Xho*I và chèn vào vector pET21a+ đã được xử lý bằng 2 enzyme tương ứng tạo ra plasmid biểu hiện pEFabs. Các dòng plasmid tái tổ hợp mang gen mã hóa β -subunit của F0F1-ATPase (pEFabs) được chọn lọc bằng cách cắt kiểm tra với *Nde*I và *Xho*I trước khi biến nạp vào *E. coli* BL21(DE3) để biểu hiện gen đích.

Plasmid tái tổ hợp pEFabs được biến nạp vào *E. coli* BL21 (DE3). Một khuẩn lạc riêng rẽ được nuôi lắc trong 10 ml môi trường LB lỏng bổ sung ampicillin (50 μ g/ml) ở 37°C đến khi OD₆₀₀ đạt 0,6-1 thì cảm ứng với IPTG nồng độ cuối cùng là 1 mM.

Dịch tế bào tiếp tục được nuôi lắc và lấy mẫu sau 1, 2, 3 và 4 h cảm ứng để điện di kiểm tra sự biểu hiện của protein tái tổ hợp Fabs. Protein Fabs tái tổ hợp biểu hiện dưới dạng dung hợp có gắn thêm 6 histidine, do đó được tinh sạch bằng cột ái lực ProBond™ Nickel-Chelating Resin (Invitrogen) theo hướng dẫn của Invitrogen có sự cải biến (Đồng Văn Quyền *et al.*, 2008).

Gây miễn dịch trên thỏ tạo kháng thể anti-Fabs

Kháng thể kháng β -subunit tái tổ hợp (anti-Fabs) được sản xuất như đã mô tả (Hanley *et al.*, 1995). Để tạo kháng thể, 200 μ g protein β -subunit tái tổ hợp tinh sạch được sử dụng cho một lần gây miễn dịch trên thỏ. Quá trình gây miễn dịch được lặp lại 4 lần, mỗi lần cách nhau 5 ngày. Ở lần thử nhất, protein được trộn với tá chất Freund toàn phần (complete freund's adjuvant) theo tỷ lệ 1:1, ở các lần còn lại protein được trộn với tá chất Freund không hoàn toàn (incomplete freund's adjuvant). Sau 5 ngày kể từ lần gây miễn dịch cuối cùng, máu thỏ được lấy ra, ủ 4 h ở 37°C, sau đó để 4 - 6 h ở 4°C để tách riêng huyết thanh. Huyết thanh được tách bằng cách ly tâm loại bỏ mẫu toàn phần, chia nhỏ vào các ống effendorf và bảo quản ở -80°C.

Tinh chế chromatophore từ *Rhodospirillum rubrum*

Chromatophore được tách chiết theo phương pháp của (Stanley, Allen, 1965). Mô tả văn tắt như sau: tế bào nuôi cấy vi khuẩn *Rhodospirillum rubrum* được thu nhận bằng ly tâm 4200 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C. Rửa tế bào 3 lần bằng nước khử ion lạnh, hòa lại trong đệm phosphate 0,02 M (pH 7.0) có chứa $MgSO_4$ 0,01M theo tỉ lệ 5mg tế bào/1ml đệm. Tế bào được phá bằng máy phá áp lực French Press (20.000 psi) để giải phóng chromatophore sau đó ủ với Deoxyribonuclease theo tỉ lệ 0.5 mg/ml dịch phá tế bào trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Ly tâm 104.000 g trong 1 h ở 4°C, loại bỏ dịch nổi, thu cặn và hòa lại trong đệm phosphate (0,02M). Cuối cùng chromatophore được phân tách bằng ly tâm siêu tốc gradient nồng độ sucrose.

Lai Western

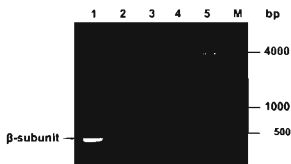
Chromatophore (5-15 μ g) chứa F0F1-ATPase tách chiết ở trên được phân tách trên gel 12% polyacrylamide, sau đó chuyển sang màng PVDF. Màng được phủ qua đêm ở 4°C bằng sữa tách bơ (skim milk) 5% pha trong đệm TBS (50 mM

Tris.HCl, pH 7.4 and 150 mM NaCl). Sau khi rửa 3 lần 5 phút với TBST (TBS + 0.1% Tween 20), màng được ủ với kháng thể kháng β -subunit (anti-Fabs) chuẩn bị ở trên pha loãng 500 lần trong 5% sữa gầy, lắc 2 h ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa tiếp 3 lần 5 phút với TBST, màng được ủ với kháng thể 2 (cộng hợp kháng IgG thô gắn HRP) pha loãng 10.000 lần trong 5% sữa gầy, lắc 2 h ở nhiệt độ phòng. Rửa màng 3 lần 5 phút với TBST và 1 lần với TBS. Cuối cùng ủ màng trong dung dịch chất hiện màu (5 ml methanol + 15 mg chất hiện màu pha trong 25 ml TBS + 15 μ l 30% H_2O_2) trong 10 phút và đọc kết quả.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách dòng đoạn gen mã hóa β -subunit của F0F1-ATPase

Gen *F0F1-ATPase β -subunit* (1422 bp) (viết tắt là *fabs*) mã hóa một protein (Fabs) có khối lượng phân tử khoảng 51 kDa. Tuy nhiên, mục đích là tạo kháng thể đặc hiệu kháng lại tiểu phần này vì vậy chỉ đoạn gen mang các quyết định kháng nguyên quan trọng của protein này mới được biểu hiện và do đó hạn chế được những sự tương tác không đặc hiệu giữa kháng thể kháng β -subunit (anti-Fabs) với các kháng nguyên ngoại lai trong các nghiên cứu sau này. Đoạn gen này được thiết kế dựa vào từ trình tự công bố trên GenBank (X07804) và kết quả của các nghiên cứu trước (Montemagno *et al.*, 1999, Liu *et al.*, 2006). *fabs* được khuếch đại bằng PCR sử dụng khuôn genomic DNA từ *Bacillus* SP3 và cặp mồi đặc hiệu BetaF và BetaR. Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR cho một băng DNA có kích thước ~380 nucleotide, đúng với kích thước theo lý thuyết, được khuếch đại đặc hiệu (Hình 1. giống 1).



Hình 1. Điện di đồ gel agarose 1,5 % sản phẩm PCR *fabs* (1); Sản phẩm cắt pCFabs bằng *Nde*I và *Xho*I (2-5), Thang DNA 1 kb (M).

Sản phẩm PCR *fabs* được gắn vào vector pCR2.1 tạo ra pCFabs, biến nạp vào *E. coli* DH5 α . Một số khuẩn lạc trắng được nuôi lắc trong môi trường LB có bổ sung Amp. plasmid được tinh sạch và cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn *Nde*I và *Xho*I. Cả 4 dòng plasmid thu được đều mang đoạn DNA có

kích thước ~400 bp, tương ứng với kích thước *fabs* theo lý thuyết (Hình 1, giếng 2-5). Để khẳng định chắc chắn, đoạn gen đã tách dòng được giải trình tự và phân tích bằng phần mềm BLAST. Kết quả cho thấy đoạn gen vừa tách dòng đúng là β -subunit của FOF1-ATPase (Hình 2).

```

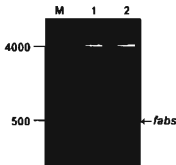
atgacatcgcggtgctgtggcgccggaaatcgctggcgaggagcattatcaagtcgcccgc
M T S R A L A P E I V G E E H Y Q V A R
aaagtgcagcaaacgctcgaacgttataaagaattgcaagacatcatcgccatcttgggg
K V Q Q Q T L E R Y K E L Q D I I A I L G
atggatgaactgtcggatgaagacaactcgctcgctcgccgcgcgcgcagcttc
M D E L S D E D K L V V H R A R R I Q F
ttcttgtcgcaaaacttccacgtggcgaggcagttcacgggccaaaccgggctcgtacgtg
F L S Q N F H V A E Q F T G Q P G S Y V
ccggtgaaagaaacagtcgcgcggctttaagaaattttggaaggcaaatacgaccatctt
P V K E T V R G F K E I L E G K Y D H L
ccggaagatcggttccgcttagtcggccgcattgaagaagtcggtgaaaagcgaaagcg
P E D R F R L V G R I E E V V E K A K A
atgggtgtc
M G V

```

Hình 2. Trình tự nucleotide và amino acid suy diễn đoạn gen mã hóa β -subunit của FOF1-ATPase.

Biểu hiện và tinh sạch β -subunit của FOF1-ATPase ở *E. coli* BL21

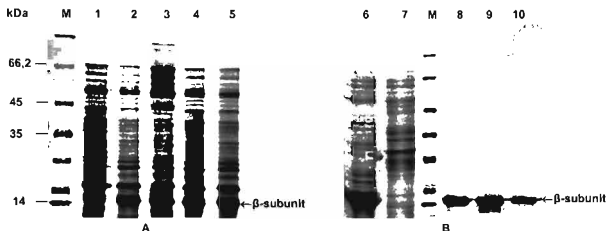
fabs được cắt ra khỏi pCFabs bằng *Nde*I và *Xho*I và gắn vào vector pET21a+ đã được xử lý bằng 2 enzyme tương ứng tạo ra plasmid biểu hiện pEFabs. Các plasmid tái tổ hợp pEFabs được biến nạp vào *E. coli* DH5 α và chọn lọc bằng cách cắt kiểm tra với cùng 2 enzyme trên. Chúng tôi chọn được 2 dòng plasmid pEFabs mang đoạn gen *fabs*. Sau khi tinh sạch lượng lớn, pEFabs một lần nữa được cắt kiểm tra bằng *Nde*I và *Xho*I trước khi biến nạp vào *E. coli* BL21(DE3) để biểu hiện gen đích (hình 3).



Hình 3. Điện di đol gel agarose 1.5% sản phẩm cắt pEFabs với *Nde*I và *Xho*I (1-2); Thang DNA 1 kb (M).

Plasmid tái tổ hợp pEFabs được biến nạp vào *E. coli* BL21 (DE3). Một khuẩn lạc riêng rẽ được nuôi lắc trong môi trường LB chọn lọc biểu hiện protein tái tổ hợp như mô tả ở trên. Fabs tái tổ hợp biểu hiện ra có kích thước khoảng 15 kDa, tương ứng với kích thước lý thuyết của β -subunit của FOF1-ATPase. Mức độ biểu hiện của Fabs tăng dần theo thời gian nuôi cấy và đạt tối đa sau 3 h cảm ứng với IPTG (hình 4, giếng 2-5). Một số điều kiện biểu hiện đã được thay đổi để tìm ra điều kiện tối ưu như nhiệt độ biểu hiện (37, 30 và 25°C), nồng độ chất cảm ứng IPTG (1, 0.5 và 0.2 mM). Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy, Fabs tái tổ hợp luôn biểu hiện ở dạng thể vùi và điều kiện tối ưu là ở 37°C, 1 mM IPTG và sau cảm ứng IPTG 3 h (kết quả không nêu ở đây).

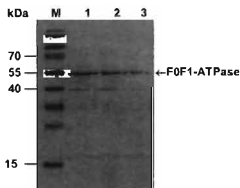
Do protein tái tổ hợp Fabs gắn thêm 6-histidine tại đầu C nên được tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực ProBond™ Nickel-Chelating Resin. Quá trình tinh sạch được trình bày ở trên. Các phần đoạn khác nhau chứa β -subunit của FOF1-ATPase tái tổ hợp sau tinh sạch được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE. Kết quả cho thấy, Fabs tái tổ hợp có độ tinh sạch cao không lẫn protein của *E. coli* và có thể dùng để tạo kháng thể (Hình 4, giếng 8-10).



Hình 4. Điện di đồ gel SDS-PAGE kiểm tra sự biểu hiện của Fabs (A) và protein tái tổ hợp sau khi tinh sạch (B): Dịch tế bào *E. coli* trước (1) và sau cảm ứng với IPTG 1, 2, 3, 4 h (2-5). Mẫu protein lỏng sơ trước khi qua cột (6); Dịch chảy qua cột (7); Các phân đoạn 1-3 tinh sạch bằng ProBond™ Nickel-Chelating Resin (8-10).

Tạo kháng thể kháng β -subunit tái tổ hợp

Trong biosensor dùng để chẩn đoán các tác nhân gây bệnh thì kháng thể kháng β -subunit (anti-Fabs) là một trong những "cầu phân" chính. Nguyên lý hoạt động và cấu tạo của biosensor đang phát triển đã được nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới nghiên cứu (Liu *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2007, Deng *et al.*, 2007). Trong nghiên cứu này, anti-Fabs được tạo ra trên thỏ gây miễn dịch với β -subunit tái tổ hợp. Quy trình tạo kháng thể được tiến hành như mô tả ở trên (Hanley *et al.*, 1995).



Hình 5. Lai Western giữa anti-Fabs với F0F1-ATPase trong chromatophore từ *Rhodospirillum rubrum*. Protein marker (M); Kháng nguyên F0F1-ATPase với hàm lượng protein tương ứng là 10, 5 và 3 μ g (1, 2 và 3).

Để kiểm tra xem anti-Fabs có phản ứng với β -subunit tự nhiên hay không, lai Western được thực hiện giữa anti-Fabs với kháng nguyên F0F1-ATPase trong chromatophore tách chiết từ *R. rubrum*. Như trình bày ở trên, F0F1-ATPase là một enzyme bảo

thù ở tất cả các sinh vật vì vậy kháng thể tạo ra phải phản ứng với kháng nguyên tự nhiên. Kết quả lai Western (Hình 5) cho thấy, anti-Fabs phản ứng đặc hiệu với kháng nguyên β -subunit tự nhiên, thể hiện bởi một băng phản ứng với kích thước khoảng 54 kDa tương đương với kích thước của F0F1-ATPase. Mức độ phản ứng tăng dần khi tăng nồng độ của kháng nguyên. Kết quả này cũng cho thấy đoạn gen β -subunit mà chúng tôi tách dòng và biểu hiện mang các quyết định kháng nguyên quan trọng của tiểu phân này. Kháng thể này sẽ được tinh sạch và dùng để phát triển biosensor sau này.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tách dòng và biểu hiện thành công β -subunit của F0F1-ATPase (Fabs) từ *Bacillus* PS3 ở *E. coli*. Protein tái tổ hợp biểu hiện ở dạng thể vùi có gắn thêm 6 histidine đầu C (Fabs), được tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực với độ tinh sạch cao và dùng để tạo kháng thể. Kháng thể kháng β -subunit tái tổ hợp (anti-Fabs) phản ứng đặc hiệu với kháng nguyên F0F1-ATPase tự nhiên. Anti-Fabs có tiềm năng để phát triển biosensor có độ nhạy và độ đặc hiệu cao dùng trong chẩn đoán các tác nhân gây bệnh như vi virus, vi khuẩn và các marker ung thư.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí của đề tài độc lập cấp nhà nước "Chế tạo và nghiên cứu sử dụng các cảm biến từ CdSe/ZnS với các lớp vỏ đã được biến tính làm chất đánh dấu huỳnh quang sinh học, phục vụ cho sản xuất và xuất khẩu các sản phẩm nông nghiệp" và Phòng Vi sinh vật học Phân tử. Công trình được

thực hiện tại Viện Công nghệ sinh học có sử dụng các thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen. Các tác giả xin chân thành cảm ơn giáo sư Hideo Akutsu tại Viện Nghiên cứu Protein, Đại học Osaka Nhật Bản đã cung cấp genomic DNA chủng *Bacillus* SP3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Angewine CM, Fillingame RH (2003) Aqueous access channels in subunit a of rotary ATP synthase. *J Biol Chem* 278: 6066-6074.

Cui YB, Zhang F, Yue JC (2005) Detecting flux across chromatophores driven by F₀F₁-ATPase using N-(fluorescein-5-thiocarbonyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero phosphoethanol amine, triethylammonium salt. *Anal Biochem* 344: 102-107

Deng Z, Zhang Y, Yue J, Tang F, Wei Q (2007) Green and orange CdTe quantum dots as effective pH-sensitive fluorescent probes for dual simultaneous and independent detection of viruses. *J Phys Chem B* 111(41): 12024-12031.

Đồng Văn Quyền, Hoàng Anh, Bạch Thị Như Quỳnh, Phạm Minh Tuấn, Nguyễn Thanh Tùng, Lê Thị Tâm, Đinh Duy Kháng (2008) Tách dòng và biểu hiện gen P24 từ chủng HIV lưu hành ở Việt Nam và nghiên cứu phản ứng của protein tái tổ hợp với kháng thể kháng HIV trong huyết thanh bệnh nhân. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6(1): 27-34.

Đồng Văn Quyền, Yu Yeon Gyu, Đinh Duy Kháng (2005)

Biểu hiện và tinh sạch vùng preS của virus viêm gan B phân lập từ sinh thiết khối u của bệnh nhân ung thư gan. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 43(2): 31-37.

Hanley WC, Artwohl JE, Bennett BT (1995) Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry. *ILAR J* 37: 93-118.

Lee J, Choi Y, Kim J, Park E, Song R (2009) Positively charged compact quantum Dot-DNA complexes for detection of nucleic acids. *Chem Phys Chem* 10(5):806-811.

Liu HQ, Schmidt JJ, Bachand GD, Rizk SS, Looger LL, Hellinga HW, Montemagno CD (2002) Control of a biomolecular motor-powered nanodevice with an engineered chemical switch. *Nat Mater* 1: 173-177.

Liu X, Zhang Y, Yue J, Jiang P, Zhang Z (2006) F₀F₁-ATPase as biosensor to detect single virus. *Biochem Biophys Res Commun* 21, 342(4): 1319-1322

Montemagno C, Bachand G, Stelick S, Bachand M (1999) Constructing biological motor powered nanomechanical devices. *Nanotechnology* 10: 225-231.

Stanley CH, Allen GM (1965) Isolation and purification of the intracytoplasmic membranes of *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol* 89(5):1413-1420

Vik SB, Long JC, Wada T, Zhang D (2000) A model for the structure of subunit a of the *Escherichia coli* ATP synthase and its role in proton translocation. *Biochim Biophys Acta* 1458: 457-466.

Zhang D, Vik SB (2003) Close proximity of a cytoplasmic loop of subunit a with c subunits of the ATP synthase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 278: 12319-12324

EXPRESSION AND PURIFICATION OF β -SUBUNIT F₀F₁-ATPase FROM *BACILLUS* IN *E. COLI* AND PRODUCTION OF POLYCLONAL ANTIBODY AGAINST THE RECOMBINANT PROTEIN

Nguyễn Thị Hoa¹, Đồng Văn Quyền¹, Vũ Thị Hiền¹, Nguyễn Thanh Tùng¹, Lê Phương Hằng¹, Nguyễn Quang Liêm², Đinh Duy Kháng^{1,*}

¹Institute of Biotechnology

²Institute of Material Science

SUMMARY

The current outbreak of emerging microbial pathogens worldwide has stressed the importance and urgency of molecular surveillance of viruses. The rapid, specific and sensitive methods for detection of viruses play a key role in the success of control and prevention of virus infections. A number of methods have been developed to detect viruses, including immunological assays, transmission electron microscopy and PCR-based viral nucleic acid detection, and even optical microscopes. However, most of them are time consuming and require purifying the samples. Therefore, researchers are moving toward a potential approach which applies nanotechnology for development of biosensor to improve the sensitivity and detection of viruses. Herein, we

* Author for correspondence: Tel. +84-4-37563386; E-mail: khng_vsp@yaho.com

report the results on expression of β -subunit of the *Bacillus* SP3 F0F1-ATPase in *E. coli* and production of antibody against the recombinant protein. In order to achieve this, the DNA sequence encoding β -subunit was amplified directly from genomic DNA of *Bacillus* SP3 by PCR, cloned into pCR2.1 vector and analyzed by restriction enzymes and DNA sequencing. This domain was then constructed into pET21a+ vector for expression in *E. coli* BL21 (DE3) strain. The recombinant β -subunit protein was purified by ProBond™ Nickel-Chelating Resin (Invitrogen) and was used to produce its polyclonal antibodies in rabbit. Five days after the last injection, rabbit was sacrificed and the total blood was collected. The serum was separated from the total blood and stored at -80°C until use. The Western blot analysis showed that the antibodies reacted specifically toward β -subunit of F0F1-ATPase present in chromatophore extracted from *Rhodospirillum rubrum*. These polyclonal antibodies have a potential to develop a biosensor to detect pathogens including viruses, bacterium and tumor cancer.

Keywords: antibodies anti-Fabs, *Bacillus* SP3, β -subunit from F0F1-ATPase, cloning, expression, purification, *Rhodospirillum rubrum*