

BIỂU HIỆN, TÍNH CHÉ KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG TÁI TỔ HỢP KHÁNG H5 VÀ ỨNG DỤNG CHO PHÁT HIỆN NHANH VIRUS H5N1

Hoàng Hà, Phan Trọng Hoàng, Nguyễn Hữu Cường, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Hà

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

H5N1 là virus gây nên đại dịch cúm gia cầm ở nhiều quốc gia trên thế giới, gây thiệt hại rất lớn về kinh tế và sức khỏe con người. Virus H5N1 chứa hệ gen RNA sợi đơn âm gồm 8 phân đoạn mã hóa 8 loại protein. Trong đó HA, NA và M là những protein có khả năng gây miễn dịch ở tế bào. Chẩn đoán và điều trị sớm đóng vai trò quan trọng trong việc chiến thắng căn bệnh cúm đồng thời giúp ngăn chặn nguy cơ bùng phát thành đại dịch. Dựa trên cơ chế miễn dịch học, bằng kỹ thuật ELISA, kháng thể đã tạo ra sẽ được sử dụng để phát hiện loại virus gây bệnh này, từ đó có phương pháp phòng chống hiệu quả. Hiện nay, việc tạo ra các kháng thể tái tổ hợp đơn chuỗi (scFv) từ thư viện Phage display là một trong những hướng tiềm năng để tạo ra nguồn kháng thể sử dụng trong các phương pháp chẩn đoán nhanh. Các kháng thể tái tổ hợp này được tạo ra nhờ kỹ thuật biểu hiện và tinh sạch trong các hệ thống biểu hiện như virus, vi khuẩn, nấm men, động vật và thực vật. Với các ưu điểm như chi phí thấp, thời gian sản xuất kháng thể nhanh, hệ thống biểu hiện vi khuẩn hiện là sự lựa chọn phổ biến và thường xuyên ở các phòng thí nghiệm. Trong bài viết này chúng tôi đưa ra kết quả nghiên cứu về biểu hiện tinh sạch kháng thể scFv đặc hiệu H5 của virus H5N1, và bước đầu thử nghiệm phát hiện virus H5N1 bằng ngưng kết latex, tạo cơ sở cho sản xuất kit chẩn đoán nhanh phục vụ cho công tác phát hiện bệnh, cũng như đánh giá mức độ sạch bệnh của gia cầm ở Việt Nam.

Từ khóa: Hemagglutinin, H5N, hạt latex, biểu hiện, kháng thể

TỔNG QUAN

A/H5N1 là chủng virus gây cúm gia cầm nguy hiểm nhất hiện nay đã lan truyền trên 40 quốc gia ở châu Á, Trung đông, châu Âu và châu Phi. Việt Nam là một trong những quốc gia bị dịch cúm A/H5N1 bùng phát dữ dội nhất, gây thiệt hại lớn kinh tế và sức khỏe con người. Trong một thời gian ngắn, Việt Nam trở thành một trong những quốc gia “điểm nóng” về dịch cúm gia cầm. Những tháng đầu năm 2010, tình hình dịch cúm H5N1 vẫn có những diễn biến phức tạp với số ca mắc cúm A/H5N1 có thể nói là “bất thường” so với những năm trước đó khi chỉ trong 2 tháng đầu năm số ca nhiễm cúm đã bằng tổng số ca mắc cả năm 2009. Theo thông báo số 372/TB-DPMT ngày 17 tháng 3 năm 2010 về tình hình dịch cúm A(H5N1) của Cục Y tế Dự phòng và Môi trường Bộ Y tế, tính đến ngày 04/3/2010 trên toàn Thế giới ghi nhận 486 trường hợp dương tính cúm A(H5N1) tại 15 Quốc gia, trong đó có 287 trường hợp tử vong (<http://cucytegiaothong.mt.gov.vn/PrintView.aspx?ArticleID=2186>).

Virus cúm A/H5N1 thuộc họ Orthomyxoviridae type A là virus RNA, chứa hệ gen là RNA sợi đơn âm (ss(-)RNA) bao gồm 8 phân đoạn, có độ dài tổng

số khoảng 13.500 nucleotide. Phân đoạn 1 - 3 mã hóa cho protein PB1, PB2 và PA có chức năng là enzyme *polymerase*, điều khiển tổng hợp ribonucleic acid nguyên liệu cho hệ gen và RNA thông tin. Phân đoạn 4 mã hóa cho protein *hemagglutinin* (HA) là protein “độc”, mang tính gây bệnh, có tính kháng nguyên và có khả năng ngưng kết với hồng cầu gà. Phân đoạn 5 mã hóa *nucleoprotein* (NP) là protein có trách nhiệm bao bọc hệ gen. Phân đoạn 6 là gen chịu trách nhiệm tổng hợp enzyme *neuraminidase* (NA), cắt đứt tế bào giải phóng virus khỏi tế bào, sau chu kỳ nhân lên của chúng. Phân đoạn 7 mã hóa 2 tiểu phần *protein đệm* M1 và M2 (*matrix protein*) có chức năng tập hợp virus và tạo kênh chuyển vận ion qua màng nhân. Hai protein này được mã hóa từ một RNA nhưng các khung đọc khác nhau. Phân đoạn 8 mã hóa 2 tiểu phần *protein không cấu trúc* NS1 và NS2 (*non-structural protein*) đa chức năng (Bender *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2005; Farshid., 2006; Wagner *et al.*, 2002).

Chẩn đoán và điều trị sớm đóng vai trò quan trọng trong việc chiến thắng căn bệnh cúm đồng thời giúp ngăn chặn nguy cơ bùng phát thành đại dịch. Việc ứng dụng các biện pháp sinh học phân tử vào nghiên cứu các virus gây bệnh trên gia cầm là nhu cầu cấp thiết và đóng vai trò quan trọng trong công

tác phòng chống đại dịch. Cho đến nay chẩn đoán cúm A (H5N1) chủ yếu kỹ thuật RT-PCR (PCR phiên mã ngược) và Real time PCR (PCR thời gian thực). Ở Việt Nam chỉ có một vài nơi (Viện vệ sinh dịch tễ trung ương, bệnh viện Bạch Mai, đơn vị nghiên cứu lâm sàng Đại học OXFORD) thực hiện được và cũng mất một ngày (http://bachmai.gov.vn/index.php?option=com_content&task=view&id=88&Itemid=33) để nhận được kết quả. Hiện nay trên thế giới, để xác định nhanh và chính xác virus gây bệnh cũng như kiểm tra mức độ nhiễm bệnh của gia cầm người ta có thể sử dụng kháng thể đơn dòng tái tổ hợp từ nguồn kháng nguyên đặc hiệu của virus như protein vỏ, protein đệm... Trên cơ chế miễn dịch học, các kỹ thuật ELISA, ngưng kết latex và que thử đã được áp dụng để chẩn đoán nhanh dựa vào ngưng kết kháng nguyên kháng thể (Bang, 1990; Phạm Văn Ty, 2004)... Kháng thể tạo ra sẽ được sử dụng để phát hiện loại virus gây bệnh, từ đó có phương pháp phòng chống hiệu quả (Nisengard *et al.*, 1992; Carney, 1990; Chen *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2005). Hiện nay, việc tạo ra các kháng thể tái tổ hợp đơn chuỗi (scFv) từ thư viện Phage display đang là một trong những hướng tiềm năng để tạo ra nguồn kháng thể sử dụng trong các phương pháp chẩn đoán nhanh. Các kháng thể tái tổ hợp này được tạo ra nhờ kỹ thuật biểu hiện và tinh sạch trong các hệ thống biểu hiện như virus, vi khuẩn, nấm men, động vật và thực vật. Với các ưu điểm như chi phí thấp, thời gian sản xuất kháng thể nhanh, hệ thống biểu hiện vi khuẩn đang là sự lựa chọn phổ biến và thường xuyên ở các phòng thí nghiệm. Trong bài viết này, chúng tôi đưa ra kết quả nghiên cứu về biểu hiện tinh sạch kháng thể scFv đặc hiệu H5 của virus H5N1, và bước đầu thử nghiệm phát hiện virus H5N1 bằng ngưng kết latex, tạo cơ sở cho sản xuất kit chẩn đoán nhanh phục vụ cho công tác phát hiện bệnh, cũng như đánh giá mức độ sạch bệnh của gia cầm ở Việt Nam.

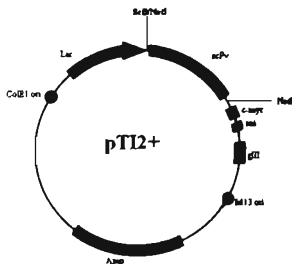
VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chúng *E. coli* HB2151 được dùng để biểu hiện scFv. Vector pTI2+ chứa đoạn gen mã hóa scFv (Hình 1). Kháng thể scFv đã được sàng lọc trong thư viện bằng kỹ thuật phage display, có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên H5 của virus cúm A do Phytoantibodies Lab - Viện Di truyền thực vật và Nghiên cứu cây trồng (IPK-Gatersleben), Cộng hòa liên bang Đức cung cấp. Cặp mồi đặc hiệu pTI-*NcoI*-

F (5' - AGG GAT CCT TAC TCG CGG CCC AGC CGG CCA TGG - 3') và pTI-*NotI*-R (5' - CGT GAT GCT TAT GAT GAT GTG CGG CCG C - 3') được thiết kế trên cơ sở trình tự gen mã hóa ScFv24.

Dịch niệu trứng gà chứa virus H5N1 với hiệu giá HA là 256 do phòng vi sinh vật phân tử Viện Công nghệ sinh học cung cấp.



Hình 1. Sơ đồ vector pTI2+ -scFv.

Phương pháp

Vector tái tổ hợp pTI2+ được biến nạp vào chủng biểu hiện HB2151 bằng phương pháp sốc nhiệt (Cohen, 1972). Kết quả biến nạp được kiểm tra bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu pTI-*NcoI*-F và pTI-*NotI*-R. Chu trình thực hiện bao gồm: biến tính đầu tiên ở 94°C/3 phút, thực hiện trong 25 chu kỳ (biến tính 94°C/50 giây, bắt cặp mồi 54°C/50 giây, kéo dài 72°C/1 phút 30 giây); kéo dài hoàn toàn ở 72°C/10 phút và kết thúc phản ứng ở 4°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%.

scFv được biểu hiện trong tế bào *E. coli* HB2151 theo qui trình sau: vi khuẩn biến nạp được nuôi cấy trong môi trường có kháng sinh chọn lọc là Ampicillin và chất cảm ứng IPTG. Trước khi thực hiện cảm ứng bằng IPTG các tế bào vi khuẩn *E. coli* HB2151 chứa plasmid tái tổ hợp được hoạt hoá bằng cách nuôi cấy lắc ở nhiệt độ 37°C trong môi trường chứa kháng sinh Ampicillin 100 mg/l cho đến mật độ tế bào thích hợp (OD_{600nm} thường nằm trong khoảng 0,4 đến 0,6). Chúng tôi tiến hành bổ sung chất cảm ứng IPTG đến nồng độ cuối cùng là 1mM. Sau 2,5 h cảm ứng IPTG ở nhiệt độ 30°C, thu sinh khối tế bào bằng ly tâm 5000 vòng/5 phút. Phả vỡ tế bào vi

khuan bằng siêu âm ở cường độ 60 trong đệm PBS IX. Ly tâm thu lấy dịch tan của tế bào và điện di kiểm tra sản phẩm trên gel polyacrylamid 12,6%.

Protein tái tổ hợp được tinh sạch bằng cột ái lực Niken Resin trong bộ sinh phẩm Probond Nickel-Chelating Resin (Invitrogen), sau đó được kiểm tra trên gel polyacrylamid 12,6%. Hàm lượng protein được xác định bằng phương pháp Bradford (1976).

Gắn kháng thể scFv lên bề mặt latex

Kháng thể scFv được gắn lên bề mặt hạt latex theo quy trình của hãng Bangslab (<http://www.bangslabs.com>). Trước khi gắn kháng thể scFv đặc hiệu H5, hạt latex được rửa 4 lần bằng dung dịch đệm. Sau đó, hạt sẽ được kích hoạt bằng cách trộn lẫn 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDAC). Đây là một chất kích hoạt, nó sẽ gắn tạm thời lên nhóm chức COOH trên bề mặt hạt latex để tạo ra một liên kết có độ linh động cao. Sau đó hạt latex với nhóm chức được kích hoạt sẽ được trộn với kháng thể scFv. Khi đó nhóm amin bậc I của kháng thể scFv đặc hiệu H5 sẽ liên kết với nhóm COOH đã được kích hoạt bằng EDAC tạo ra hạt latex gắn protein H5.

Kiểm tra tính ngưng kết của hạt Latex đã gắn protein lên bề mặt

Sử dụng nguyên lý ngưng kết đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể. Trong đó, hạt latex đóng vai trò làm giá đỡ làm cho các liên kết này trở nên ổn định hơn và phản ứng ngưng kết thực chất là một phản ứng trùng hợp của các hạt latex có kích thước nhỏ. Kháng nguyên trong mẫu chẩn đoán đóng vai trò cầu nối các hạt này với nhau.

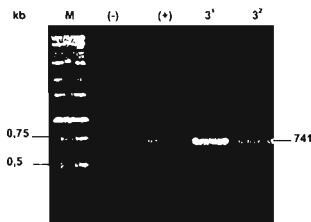
Để quan sát được bằng mắt thường phản ứng ngưng kết giữa kháng thể trên bề mặt hạt latex và kháng nguyên bề mặt H5 thì vùng tủa phải có trên 100 cụm tủa, mỗi cụm tủa có kích thước khoảng 50 μ m và chứa khoảng 105 hạt latex, trong đó mỗi hạt latex phải có ít nhất 10 kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên H5 bề mặt bám trên bề mặt. Hạt latex sau khi gắn kháng thể scFv với nồng độ khác nhau lên bề mặt sẽ được trộn với những dung dịch chứa virus để tìm ra điều kiện tối ưu của sự ngưng kết.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Biểu hiện gen mã kháng thể scFv đặc hiệu H5 trong tế bào HB 2151

Đoạn gen mã hóa kháng thể scFv đặc hiệu H5

của virus H5N1 trong vector pTI2 được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng HB2151. Kết quả thu được là có nhiều khuẩn lạc mọc được trên đĩa thạch. Để khẳng định thêm kết quả chúng tôi kiểm tra sự có mặt của đoạn gen scFv trong vector pTI2+. Chọn ngẫu nhiên 2 dòng khuẩn lạc và tiến hành PCR trực tiếp từ khuẩn lạc này với cặp mồi đặc hiệu pTI-NcoI-F và pTI-NotI-R bằng việc sử dụng cặp mồi đặc hiệu pTI-NcoI-F và pTI-NotI-R.

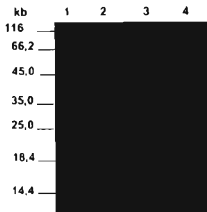


Hình 1. Sản phẩm PCR dùng mồi đặc hiệu các dòng plasmid tái tổ hợp pTI2+scFv M marker 1kb, 3.1,3.2 hai dòng khuẩn lạc.

Hình 1 cho thấy các dòng khuẩn lạc đều cho kết quả có một băng duy nhất kích thước khoảng 736 bp tương ứng với kích thước của gen scFv, chứng tỏ chúng tôi đã biến nạp thành công plasmid tái tổ hợp pTI2+scFv vào chủng *E. coli* HB2151.

Để kiểm tra khả năng biểu hiện kháng thể scFv đặc hiệu H5, các dòng khuẩn lạc này được cảm ứng IPTG và tách chiết protein tổng số. Protein từ các dòng biến nạp pTI2+scFv có xuất hiện protein kích thước khoảng 24 kDa. Kháng thể scFv biểu hiện dưới dạng tan và theo thiết kế ban đầu, kháng thể scFv có gắn đuôi 6-histidin, vì vậy chúng tôi sử dụng cột Nikel Resin Protein để tinh sạch. Hình 3 cho thấy các phân đoạn khác nhau chứa protein tái tổ hợp có độ tinh sạch khá cao. Hàm lượng protein thu được cao nhất ở các phân đoạn 2, 3.

Protein scFv sau khi tinh sạch còn chứa nhiều muối, ảnh hưởng đến hoạt tính của protein trong quá trình ngưng kết hạt latex và que thử nhanh sau này, nên chúng tôi đã sử dụng cột loại muối Nanosep để thu được protein scFv sạch. Nồng độ protein được xác định là 12,56 mg/lit môi trường nuôi khuẩn.



Hình 3. Protein scFv đặc hiệu H5 sau khi tinh sạch bằng sắc ký ái lực. 1. marker; 2-4: các phân đoạn tinh sạch

Gắn kháng thể scFv lên bề mặt latex

Kháng thể scFv được gắn lên bề mặt hạt latex theo quy trình của hãng Bangslab, theo protocol của Bangslab, 0.4mg protein scFv được dung để gắn lên 12.5mg hạt latex. Sau 15 phút gắn, chúng tôi thu được phức hợp scFv-latex. Phức hợp này được kiểm tra khả năng hoạt động bằng các thí nghiệm ngưng kết với kháng nguyên đặc hiệu cho H5.

Ứng dụng hạt latex gắn scFv trong phát hiện virus H5N1

Những hạt latex được gắn với kháng thể scFv đặc hiệu H5 được trộn lẫn với dung dịch chứa virus ở các nồng độ được pha loãng khác nhau 10 lần, 100 lần, 1000 lần để xác định mức độ ngưng kết của hạt

latex. Chúng được so sánh với đối chứng âm là hạt latex được trộn lẫn với dung dịch PBS.

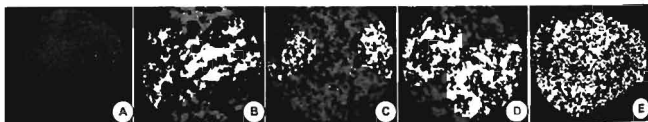
Thí nghiệm thứ nhất: với nồng độ gốc, không pha loãng (với hiệu giá HA là 256/dm vi), mức độ ngưng kết rất rõ ràng, có thể thấy được bằng mắt thường, còn khi quan sát bằng kính hiển vi có độ phóng đại là 10 thì nhận thấy vùng ngưng kết là rất lớn và có mật độ dày đặc (Hình 4B)

Ở thí nghiệm thứ hai, dung dịch niêu trứng gà pha loãng 10 lần thì sau khoảng 2 đến 3 phút sự ngưng kết xuất hiện và mật độ các vùng ngưng kết có thưa hơn và diện tích cũng nhỏ đi so với thí nghiệm thứ nhất (Hình 4C).

Thí nghiệm thứ ba, dung dịch niêu trứng gà pha loãng 100 lần sau 2 đến 3 phút quan sát bằng mắt thường khó có thể thấy được sự ngưng kết nên chúng tôi tiến hành soi dưới kính hiển vi thì thấy mật độ và diện tích các vùng ngưng kết ngày càng thưa (Hình 4D).

Ở thí nghiệm cuối cùng chúng tôi pha loãng 1000 lần lúc này không thể quan sát được hiện tượng ngưng kết bằng mắt thường nên sau khi soi dưới kính hiển vi, ảnh cho thấy mật độ lúc này là rất thưa và diện tích là rất nhỏ nên chúng tôi quyết định không pha loãng nữa (Hình 4E).

Kết quả trên cho thấy có thể ứng dụng phương pháp gắn kết hạt latex có gắn kháng thể scFv trong phát hiện nhanh virus H5N1 ở nồng độ kháng thể thấp với hiệu giá HA là 0,256.



Hình 4. Kết quả phản ứng ngưng kết soi dưới kính hiển vi có vật kính 10. A. Hạt latex trộn với dung dịch PBS. B. Hạt latex trộn với dịch niêu trứng gà hiệu giá HA là 256. C. Niêu trứng gà pha loãng 10 lần có hiệu giá HA là 25,6; D. Niêu trứng gà pha loãng 100 lần có hiệu giá HA là 2,56; E. Niêu trứng gà pha loãng 1000 lần có hiệu giá HA là 0,256

KẾT LUẬN

Kháng thể scFv đặc hiệu cho kháng nguyên H5 của cúm gia cầm H5N1 đã được biểu hiện trong *E. coli* và tinh chế thành công. Bước đầu ứng dụng thành công hạt latex có gắn kháng thể đơn dòng đặc hiệu

cho kháng nguyên HA trong phát hiện virus H5N1 trong mẫu nghiên cứu. Đây sẽ là cơ sở để ứng dụng và phát triển thành công nghệ chẩn đoán phát hiện bệnh cúm A/H5N1 trên gia cầm.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện trong khuôn khổ đề tài cấp Viện KH&CN Việt Nam: "Nghiên cứu tạo bộ sinh phẩm phát hiện nhanh virus cúm A ứng

dụng kháng thể đơn chuỗi scFv tái tổ hợp". Các thí nghiệm được tiến hành có sử dụng trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm về Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bachmai.gov.vn (2008) Chiến lược chẩn đoán sớm cúm gia cầm (H5N1) tại Bệnh viện Bạch Mai. http://bachmai.gov.vn/index.php?option=com_content&task=view&id=88&Itemid=33
- Bang LB (1990) Latex Immunoassay. *J Clin Immunoassays* 13(3): 127-131.
- Bender C, Hall H, Huang J, Klimov A, Cox N, Hay A, Gregory V, Cameron K, Lim W and Subbarao K (1999) Characterization of the surface proteins of influenza A (H5N1) viruses isolated from humans in 1997-1998. *Virology* 254: 115-123.
- Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Carney J (1990) Rapid diagnostic tests employing latex particles. *Anal Proc* 27: 99-100.
- Cheng X, Zhang Y, Kotani N, Tae W, Seungho L, Wang X, Kawashima I, Tadashi T, Naoyuki T and Koichi H (2005) Production of a recombinant single-chain variable fragment (scFv) antibody against Sulfolobus solfataricus. *Biochem* 137: 415-421.
- Cohen SN, Chang ACY, Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 2110-2114.
- cucytcgiaothong.mt.gov.vn (2010) Tình hình dịch Cúm A(H1N1), cúm A(H5N1) và các biện pháp phòng chống. <http://cucytcgiaothong.mt.gov.vn/PrintView.aspx?ArticleID=2186>
- Farshid SG (2006) The last great uncontrolled plague of mankind. *Science Cre. Qua* 3: 1-3.
- Chen J, Jin M, Yu Z, Dan H, Zhang A, Song Y, Chen H (2007) A latex agglutination test for the rapid detection of avian influenza virus subtype H5N1 and its clinical application. *J Vet Diagn Invest* 19: 155-160
- Nisengard RJ, Mikulski L, McDuffie D, and Bronson P (1992) Development of a rapid latex agglutination test for periodontal pathogens. *J Periodont* 72: 218-222.
- Phạm Văn Ty (2004) *Miễn dịch học*. Nhà xuất bản Đại học quốc gia Hà Nội: 39-78
- Wagner R, Matrosovich M, Klenk H (2002) Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infection. *Med Virol* 3: 159-166
- Xu X, Jin M, Yu Z, Li H, Qiu D, Tan Y, and Chen H (2005) Latex Agglutination Test for Monitoring Antibodies to Avian Influenza Virus Subtype H5N1. *JCM* 1953-1955.

OVEREXPRESSION AND PURIFICATION OF H5 scFv FOR A/H5N1 DETECTION

Hoang Ha, Phan Trong Hoang, Nguyen Huu Cuong, Le Van Son, Chu Hoang Ha*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

The avian flu H5N1 causes avian disease in many countries, and has already caused more than \$10 billion in losses to poultry farmers. This virus genome consists of eight segments of negative-stranded RNA, which code for 11 proteins. Among them, matrix proteins (M), hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) are important proteins, which are targets for vaccine production. The development of diagnostic kits for detection for avian infected with influenza A virus at early stages becomes crucial in disease control. Recently, recombinant Single Chain Fragment Variable (scFv) antibodies against pathogens in human have been produced using phage-display technology and successfully applied in developing diagnostic kits. Due to a number of advantages of this system, it is preferably powerful tool in creating kits to rapidly detect influenza A virus. In this study, we report effective systems for expression and purification of a scFv antibody against H5 protein of influenza A virus. The gene encoding for a scFv antibody specific for the H5 protein of influenza A virus had been previously selected and inserted into the expression vector pT12+ (unpublished results). The scFv protein is purified by affinity chromatography principles on nickel column. And then we successfully

* Author for correspondence: Tel: +84-4-37562368; E-mail: chuhoangha@ibt.ac.vn

develop a system to detect influenza A virus using the purified scFv coupling with latex beads via hemagglutination reaction.

Keywords: *antigen expression, H5N1, Hemagglutinin, latex*