

DOI:10.22144/ctu.jvn.2022.092

## TẠO DÒNG, BIỂU HIỆN VÀ TINH SẠCH PROTEIN A-L2 BẰNG SILICA

Nguyễn Thanh Tấn<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thùy Trinh<sup>1,2</sup> và Trần Văn Hiếu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Phòng thí nghiệm Cảm biến sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Bộ môn Hoá Sinh, Trường Đại học Buôn Ma Thuột

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

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 14/05/2022

Ngày nhận bài sửa: 13/06/2022

Ngày duyệt đăng: 27/06/2022

### Title:

Cloning, expression and purification of the recombinant Protein A-L2 using silica

### Từ khóa:

Cảm biến sinh học, Protein A, Protein L2, Protein A-L2, silica

### Keywords:

Protein A, Protein L2, Protein A-L2, silica, biosensors

### ABSTRACT

Protein immobilized silica (SiO<sub>2</sub>) particles are promising materials in the fields of biomedicine or biosensors. Through previous studies, it was found that the Escherichia coli ribosomal protein L2 strongly binds to silica particles. In addition, protein A which is derived from Staphylococcus aureus bacteria, is a highly stable surface receptor. The interaction between protein A and antibodies is considered one of the classical protein-protein interactions. This study created a fusion protein A subunit with recombinant L2 protein by constructing the vector pET22b-proAx1-L2. The Protein A-L2 was expressed in E. coli BL21(DE3) system and analyzed using SDS-PAGE. Based on the specific binding to silica particles, Protein A-L2 was purified by unmodified bare silica particles and a high concentration of MgCl<sub>2</sub> solution. With the purification method by silica beads, high efficiencies were achieved, such as rapid purification, cost savings, and comparative purity.

### TÓM TẮT

Các hạt silica (SiO<sub>2</sub>) được cố định protein là vật liệu đầy triển vọng trong các lĩnh vực y sinh hay cảm biến sinh học. Những nghiên cứu trước cho thấy protein ribosome L2 của vi khuẩn Escherichia coli liên kết mạnh với các hạt silica. Ngoài ra, protein A là thụ thể bề mặt có tính ổn định cao, có nguồn gốc từ vi khuẩn Staphylococcus aureus, sự liên kết giữa protein A và kháng thể được xem là một trong những tương tác protein-protein kinh điển được nghiên cứu nhiều nhất hiện nay. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm tạo tiểu phần protein A dung hợp với protein L2 tái tổ hợp bằng cách cấu trúc vector pET22b-proAx1-L2. Protein được biểu hiện thông qua hệ thống E. coli BL21(DE3) và được kiểm tra bằng SDS-PAGE. Dựa vào sự liên kết đặc hiệu với hạt silica, Protein A-L2 được tinh sạch bằng các hạt silica trần không biến tính và sử dụng dung dịch MgCl<sub>2</sub> nồng độ cao để dung ly protein mục tiêu. Phương pháp tinh sạch bằng hạt silica sẽ mang lại hiệu quả như tinh sạch nhanh chóng, tiết kiệm chi phí và độ tinh sạch tương đối.

## 1. GIỚI THIỆU

Khả năng protein có thể gắn định hướng trên các vật liệu sinh học là một chủ đề đang được các nhà

nghiên cứu quan tâm. Quá trình cố định định hướng protein lên vật liệu silica (SiO<sub>2</sub>) đóng vai trò quan trọng trong các ứng dụng thực tiễn, từ các quá trình

cảm biến nhằm phát hiện, theo dõi, chẩn đoán các bệnh cho đến việc tạo nên hệ thống phân phối thuốc nhắm trúng đích. Sự cố định protein có thể hiệu quả quá trình gắn protein lên bề mặt vật liệu thông qua các tương tác, nhằm tạo nên một phức hợp thống nhất. Các protein được cố định có thể là enzyme, kháng thể hay protein chức năng, đóng vai trò nhất định trong sinh học.

Protein A là một thụ thể bề mặt có tính ổn định cao, nặng khoảng 42 kDa, có nguồn gốc từ thành tế bào vi khuẩn *Staphylococcus aureus* (Graille et al., 2000). Protein A có thể được sản xuất thông qua *Staphylococcus aureus* hoặc bằng công nghệ protein tái tổ hợp. Protein A bao gồm năm tiểu phần tương đồng là E, D, A, B, và C theo thứ tự từ đầu N. Mỗi tiểu phần chứa khoảng 59 amino acid và có trình tự amino acid tương đồng từ 65 đến 90%. Mỗi tiểu phần đều có khả năng bám với Ig (immunoglobulin) và có ái lực cao chủ yếu với vùng Fc của nhiều lớp kháng thể của nhiều loài động vật có vú, trong đó có con người, tiêu biểu là IgG (Rahman et al., 2014). Sự bám giữa protein A và IgG được xem là một trong những tương tác protein-protein kinh điển được nghiên cứu nhiều nhất.

Để cố định được protein có định hướng trên bề mặt silica, Cha et al. (2005) đã cố định protein bằng cách gắn đuôi poly-His thông qua liên kết ion bề mặt silica. Tuy nhiên, phương pháp này cần những biến đổi trên bề mặt silica. Ngoài ra, protein bổ sung thêm chín gốc arginine (poly-Arg) đã được sử dụng để liên kết trực tiếp trên bề mặt silica mà không làm mất hoạt tính của protein và không cần biến đổi bề mặt silica, nhưng protein dung hợp với poly-Arg được dung ly chậm khỏi bề mặt silica (Fuchs & Raines, 2005). Nghiên cứu của Koji Taniguchi và các cộng sự, đã thử nghiệm và phát hiện các protein nội bào của vi khuẩn có liên kết silica không cần sự biến đổi nào về mặt hóa học hay tiền xử lý bề mặt silica (Taniguchi et al., 2007). Protein L2 của tiểu phần 50S ribosome của vi khuẩn *Escherichia coli* có trọng lượng phân tử khoảng 30 kDa, có tính bảo tồn và ổn định cao. Nghiên cứu này đã nhận thấy vùng liên kết với silica của protein L2 tại hai miền amino acid (1-60) và (203-273) mang nhiều gốc amino acid tích điện dương (Taniguchi et al., 2007). Ngoài ra, nghiên cứu cũng chứng minh được protein L2 có liên kết với bề mặt silica mạnh hơn từ 20 đến 100 lần so với các protein poly-Arg (Taniguchi et al., 2007). Vì thế, lựa chọn protein L2 để gắn các protein mục tiêu lên bề mặt silica bằng cách trộn hạt silica với dịch tổng protein ngay cả khi trong điều kiện muối cao và các chất tẩy rửa mạnh (Taniguchi et al., 2007).

Đối với nghiên cứu này, việc dung hợp tiểu phần E của protein A với protein L2 được tiến hành tạo thành phức hợp Protein A-L2 và được biểu hiện thông qua hệ thống *E. coli* với nhiều ưu điểm như tốc độ tăng trưởng nhanh, mật độ cao, kỹ thuật đơn giản và chi phí rẻ (Rosano and Ceccarelli, 2014). Dựa vào khả năng liên kết đặc hiệu với silica, Protein A-L2 được tinh sạch bằng các hạt SiO<sub>2</sub> trần không biến tính và dung ly protein mục tiêu bằng dung dịch muối MgCl<sub>2</sub> nồng độ cao (Ikeda et al., 2010). Phương pháp này mong muốn mang lại một số hiệu quả như tinh sạch nhanh chóng, tiết kiệm chi phí, độ tinh sạch cao để nhắm tới các ứng dụng về cảm biến sinh học, và tạo hệ thống vận chuyển thuốc nhắm trúng đích.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Chủng chủ và plasmid

Chủng *E. coli* DH5α [F<sup>-</sup> end A1 hsdR17 (rk-/mk-) supE44 thi λ- recA1 gyrA96 ΔlacU169 (φ80 lacZ ΔM15)] được sử dụng làm chủng chủ để nhân bản vector tái tổ hợp. Chủng *E. coli* BL21(DE3) (F<sup>+</sup> ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3) sử dụng làm chủng chủ biểu hiện protein tái tổ hợp. Gen *L2* được thu nhận từ DNA bộ gen của *E. coli* BL21(DE3). Plasmid pET22b-*proAx1* được sử dụng làm vector dòng hóa, đồng thời là vector biểu hiện protein tái tổ hợp nhờ vào promoter T7 có trên plasmid giúp kiểm soát sự biểu hiện gen thông qua chất cảm ứng IPTG. Các chủng vi sinh vật và plasmid được cung cấp bởi nhóm nghiên cứu Y sinh học GMIF, 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 plasmid tái tổ hợp pET22b-*proAx1-L2*

Gen *L2* được thu nhận từ DNA bộ gen của *E. coli* BL21(DE3) bằng kỹ thuật PCR (Máy PCR Mastercycler, Eppendorf, Đức) với chu trình luân nhiệt: 95°C trong 5 phút, tiếp theo đó là 30 chu kỳ: 95°C trong 30 giây, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây, 72°C trong 10 phút, 25°C trong 5 phút, với cặp mồi đặc hiệu (373Fhind: 5'-aagcttcagttgttaaatgtaaacg-3' và 374Rrho: 5'-ctcgagttgctacggcgacgtacg-3') (PHUSA Biochem, Việt Nam). Gen *L2* và plasmid pET22b-*proAx1* được nối với nhau bằng enzyme T4 DNA ligase (Thermo Scientific, Mỹ) sau khi được xử lý tạo đầu dính với hai enzyme cắt hạn chế *Hind*III và *Xho*I (Thermo Scientific, Mỹ) (Mai et al., 2022). Sản phẩm nối được biến nạp vào chủng *E. coli* DH5α khả nạp bằng phương pháp sốc nhiệt, sau đó sản phẩm biến nạp được trải trên đĩa LB chứa kháng

sinh Ampicillin đạt nồng độ cuối 100 µg/mL và được tiếp tục sàng lọc bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi gen và plasmid (373FHind/T7Ter).

### 2.3. Tạo dòng *E. coli* BL21(DE3) mang vector tái tổ hợp pET22b-*proAx1-L2*

Sau khi đã cấu trúc thành công plasmid tái tổ hợp pET22b-*proAx1-L2*, tiến hành thu nhận plasmid bằng phương pháp SDS-kiểm. Plasmid sau khi thu nhận được biến nạp vào chủng biểu hiện *E. coli* BL21(DE3) khả nạp bằng phương pháp sốc nhiệt và sản phẩm biến nạp được trải trên đĩa LB chứa kháng sinh Ampicillin đạt nồng độ cuối 100 µg/mL. Các dòng *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*proAx1-L2* được sàng lọc thông qua kỹ thuật PCR khuẩn lạc với cặp mồi trên plasmid (T7Pro/T7Ter) (PHUSA Biochem, Việt Nam).

### 2.4. Cảm ứng biểu hiện Protein A-L2 tái tổ hợp

Chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*proAx1-L2* được nuôi cấy lác ở 37°C trong môi trường LB chứa kháng sinh Ampicillin (100 µg/mL). Sau 16 giờ nuôi cấy, vi khuẩn được cấy chuyển với tỉ lệ 1:10 (v/v) và tiếp tục nuôi cấy lác ở 37°C. Đến khi OD<sub>600</sub> của dịch vi khuẩn đạt giá trị 0,8–1,0, chất cảm ứng IPTG được bổ sung vào ống dịch vi khuẩn sao cho nồng độ cuối đạt 0,5 mM, tiếp tục lác mẫu ở 16°C. Sau 16 giờ cảm ứng, tiến hành thu sinh khối tế bào và phá màng tế bào bằng sóng siêu âm để thu được protein ở các pha tổng, tan và tủa (Manat et al., 2016) (Nguyen et al., 2021). Sự biểu hiện của protein tái tổ hợp được kiểm tra bằng phương pháp điện di SDS-PAGE. Thực hiện đồng thời với mẫu đối chứng âm là mẫu dịch pha tổng của *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*proAx1-L2* không có cảm ứng IPTG.

### 2.5. Tinh sạch đồng thời đánh giá khả năng tương tác của Protein A-L2 bằng hạt SiO<sub>2</sub>

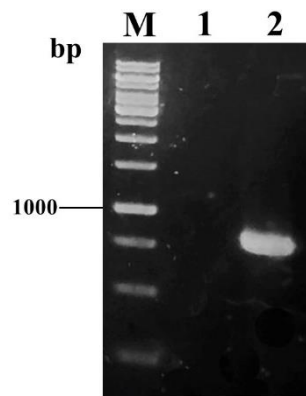
Dịch protein tổng được thu nhận sau khi chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*proAx1-L2* đã cảm ứng biểu hiện và ly giải bằng sóng siêu âm, được sử dụng làm nguồn nguyên liệu để tinh sạch. Mười mg hạt SiO<sub>2</sub> (Honeywell-FLuka) được trộn với 1 mL dịch phá tế bào trong Binding Buffer (Tris-HCl 25 mM; Tween 20 0,5% (v/v); pH 8,0), đảo đều trong 30 phút ở 4°C. Hỗn hợp ly tâm 5000 rpm trong 2 phút, thu tủa và loại bỏ dịch nổi. Hỗn hợp được rửa bằng 1 mL Wash Buffer (Tris-HCl 25 mM; Tween 20 0,5% (v/v); NaCl 0,5 M; pH 8,0) đảo đều trong 10 phút ở 4°C, ly tâm 5000 rpm trong 2 phút, loại bỏ dịch nổi và thu tủa, lặp lại khoảng ba lần. Ly giải

protein bằng Elute Buffer (MgCl<sub>2</sub> 2 M; Tween 20 0,5% (v/v)), đảo đều trong 10 phút ở 4°C, ly tâm 5000 rpm trong 2 phút, loại bỏ dịch nổi và thu tủa (Ikeda et al., 2010). Sau đó, hỗn hợp được hòa tủa với PBS (Phosphate-buffered saline) 1X và phân tích thành phần protein bằng SDS-PAGE kết hợp nhuộm bạc.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Tạo dòng *E. coli* DH5α mang vector tái tổ hợp pET22b-*proAx1-L2*

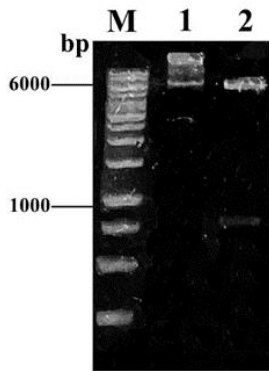
Nhằm mục đích dòng hóa vector tái tổ hợp, gen *L2* được thu nhận bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu (373FHind/374RXho). Kết quả điện di sản phẩm PCR trên bản gel agarose cho thấy vạch gen thu được nằm dưới 1000 bp của thang phân tử lượng (Hình 1, giếng 2), phù hợp với kích thước dự đoán ban đầu của gen *L2* là 816 bp. Bên cạnh đó, chứng âm của phản ứng PCR được thiết lập với đầy đủ các thành phần như phản ứng thu gen ngoại trừ khuôn là bộ gen của *E. coli* BL21(DE3) nhằm kiểm soát sự ngoại nhiễm của phản ứng PCR. Khi điện di chứng âm, không ghi nhận bất kỳ vạch DNA nào trên bản gel (Hình 1, giếng 1), điều này chứng tỏ phản ứng PCR thu gen *L2* không bị ngoại nhiễm.



**Hình 1. Kết quả PCR thu nhận gen *L2* và phân tích bằng điện di trên gel agarose 1,5%**

*M*, thang DNA 1 kb; *1*, chứng âm; *2*, sản phẩm PCR thu gen *L2*

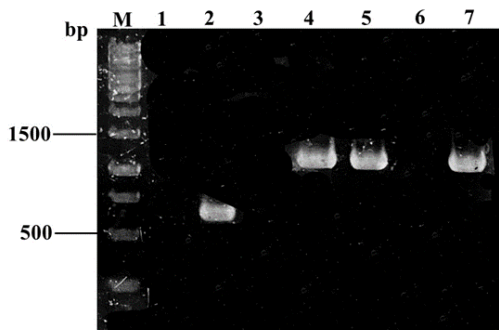
Vector pET22b-*proAx1* được thu nhận từ chủng *E. coli* DH5α bằng phương pháp SDS-kiểm. Tiến hành xử lí mẫu plasmid và gen *L2* đã thu được với cặp enzyme cắt giới hạn *Hind*III và *Xho*I. So sánh với kết quả điện di plasmid ban đầu tồn tại ở ba dạng cấu hình (Hình 2, giếng 1), plasmid đã cắt còn một dạng cấu hình dạng thẳng do đã cắt mở vòng, vạch plasmid có kích thước phù hợp và gen *L2* có kích thước khoảng 816 bp (Hình 2, giếng 2).



**Hình 2. Kết quả thu nhận, xử lý plasmid pET22b-*proAx1* và gen *L2* với cặp enzyme *HindIII/XhoI* và phân tích bằng điện di trên gel agarose 1,5%**

*M*, thang DNA 1 kb; *1*, plasmid chưa xử lý với enzyme; *2*, plasmid và gen đã xử lý với cặp enzyme *HindIII/XhoI*

Sản phẩm nối được biến nạp vào chủng *E. coli* DH5 $\alpha$  khả nạp bằng phương pháp sốc nhiệt, sau đó sản phẩm biến nạp được trải trên đĩa LB Amp100. Các khuẩn lạc phát triển trên đĩa biến nạp được chọn ngẫu nhiên để thực hiện PCR khuẩn lạc với môi trên plasmid và môi trên gen (373FHind/T7Ter). Chứng âm bao gồm các thành phần của phản ứng PCR nhưng không bổ sung khuôn nhằm đảm bảo kết quả dương tính của PCR khuẩn lạc không phải dương tính giả. Hình ảnh bản gel điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc xuất hiện vạch DNA ở giếng 4, 5, 7, Hình 3 cho kết quả xấp xỉ vạch 1300 bp của thang phân tử lượng, phù hợp với kích thước dự đoán khi PCR khuôn plasmid pET22b-*proAx1-L2*. Kết quả cho thấy có 3 trong 5 khuẩn lạc dự tuyển mang plasmid tái tổ hợp mục tiêu pET22b-*proAx1-L2*.

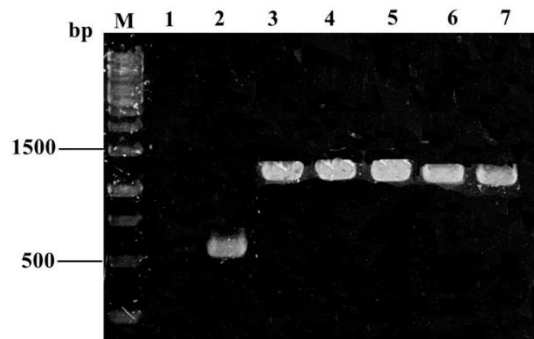


**Hình 3. Kết quả PCR sàng lọc thể biến nạp *E. coli* DH5 $\alpha$ /pET-*proAx1-L2* bằng cặp môi 373FHind/T7Ter và phân tích bằng điện di trên gel agarose 1,5%**

*M*, thang DNA 1 kb; *1*, chứng âm; *2*, plasmid pET-*proAx1*; *3-7*, các khuẩn lạc dự tuyển sàng lọc

### 3.2. Tạo dòng *E. coli* BL21(DE3) mang plasmid pET22b-*proAx1-L2* tái tổ hợp

Plasmid sau khi thu nhận được biến nạp vào chủng biểu hiện *E. coli* BL21(DE3) khả nạp bằng phương pháp sốc nhiệt và sản phẩm biến nạp được trải trên đĩa LB Amp100. Những khuẩn lạc *E. coli* BL21(DE3) mọc trên đĩa môi trường được chọn ngẫu nhiên để thực hiện PCR khuẩn lạc với cặp môi trên plasmid (T7Pro/T7Ter). Bản gel điện di Hình 4 cho thấy, sản phẩm PCR khuẩn lạc của tất cả các khuẩn lạc *E. coli* BL21(DE3) dự tuyển đều xuất hiện vạch DNA ở vị trí xấp xỉ vạch 1440 bp của thang phân tử lượng, phù hợp kích thước dự đoán khi dòng tế bào dự tuyển mang plasmid pET22b-*proAx1-L2*; đồng thời, chứng âm là sản phẩm phản ứng PCR không bổ sung khuôn không thấy xuất hiện vạch. Như vậy, có thể kết luận plasmid tái tổ hợp pET22b-*proAx1-L2* đã được biến nạp thành công vào chủng biểu hiện *E. coli* BL21(DE3), sẵn sàng để được cảm ứng biểu hiện Protein A-L2 tái tổ hợp.



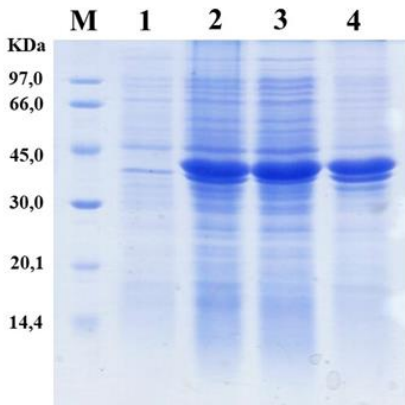
**Hình 4. Kết quả PCR sàng lọc thể biến nạp *E. coli* BL21(DE3)/pET-*proAx1-L2* bằng cặp môi T7Pro/T7ter và phân tích bằng điện di trên gel agarose 1,5%**

*M*, thang DNA 1 kb; *1*, chứng âm; *2*, plasmid pET22b-*proAx1*; *3-7*, các khuẩn lạc dự tuyển sàng lọc

### 3.3. Kiểm tra sự biểu hiện của Protein A-L2 tái tổ hợp

Protein A-L2 tái tổ hợp được cảm ứng biểu hiện từ chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*proAx1-L2* như mô tả ở phần phương pháp. Các mẫu protein pha tổng, tan và tủa được thu nhận và phân tích sự biểu hiện bằng phương pháp SDS-PAGE kết hợp nhuộm Coomassie (Hình 5). So với mẫu đối chứng *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*proAx1-L2* (-IPTG) không xuất hiện protein biểu hiện vượt mức, chứng tỏ không có sự rò rỉ biểu hiện. Tại giếng 2, 3, 4, Hình 5 thấy được vạch biểu hiện vượt mức với kích thước

xấp xỉ vạch 38 kDa trên thang phân tử lượng, phù hợp với kích thước dự đoán. Quan sát pha tan và pha tủa (Hình 5, giếng 3, 4), có thể dễ dàng thấy được protein biểu hiện vượt mức trong pha tan (Hình 5, giếng 3) so với pha tủa là tương đương nhau (Hình 5, giếng 4).



**Hình 5. Kết quả kiểm tra biểu hiện bằng điện di SDS-PAGE trên gel 15% nhuộm Coomassie**

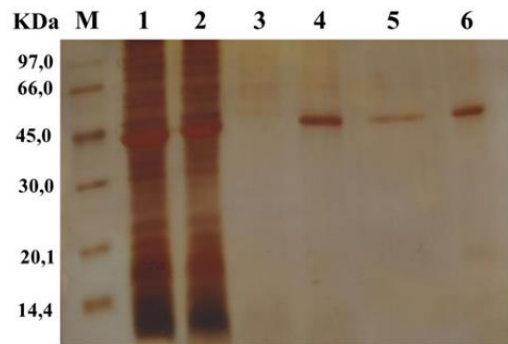
*M*, thang protein; 1, *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-proAx1-L2 (-IPTG); 2-4, *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-proAx1-L2 (+IPTG); 2, pha tồng; 3, pha tan; 4, pha tủa

### 3.4. Tinh sạch đồng thời đánh giá khả năng tương tác của Protein A-L2 bằng hạt silica

Protein A-L2 được biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli* dưới sự kiểm soát của T7 promoter. Protein tái tổ hợp được tồn tại ở pha tan, tiến hành tinh sạch Protein A-L2 bằng hạt SiO<sub>2</sub>. Kết quả phân tích cho thấy, sử dụng SiO<sub>2</sub> như là chất hấp thụ Protein A-L2. Khi trộn SiO<sub>2</sub> với dịch tổng protein trong đệm Binding Buffer có mặt NaCl và Tween để giảm thiểu sự bám không đặc hiệu của các protein khác. Tiếp theo, dung dịch Wash Buffer được dùng để rửa và loại bỏ các thành phần tạp nhiễm có trong mẫu. Protein mục tiêu mang nhiều nhóm chức khác nhau thuộc các nhánh bên của amino acid như carboxyl, amine, hydroxyl, và sulfhydryl. Nhờ vào các nhóm chức này, protein có thể tích điện dương và hình thành tương tác ion với bề mặt silica tích điện âm. Vì thế, khi tiến hành dung ly Protein A-L2 đã sử dụng dung dịch MgCl<sub>2</sub> 2 M nhằm tạo lực ion mạnh của Mg<sup>2+</sup> để cạnh tranh và từ đó giải phóng protein mục tiêu ra khỏi SiO<sub>2</sub> (Taniguchi et al., 2007). Các phân đoạn protein được phân tích bằng kỹ thuật SDS-PAGE kết hợp với nhuộm bạc. Kết quả tinh sạch thể hiện trên bản gel acrylamide cho thấy có vạch đậm với kích thước khoảng 38 kDa của protein mục tiêu hiện diện ở dịch tổng protein (Hình 6, giếng 1). Sau khi bám SiO<sub>2</sub> (Hình 6, giếng 2), mẫu

dịch nổi vẫn thấy xuất hiện protein mục tiêu. Điều này có thể giải thích do bề mặt hạt SiO<sub>2</sub> có giới hạn nên lượng protein mục tiêu cho bám vẫn còn thừa ở dịch nổi. Ngoài ra, dịch nổi ở các lần rửa chứa những protein tạp khác cho thấy đã có sự loại bỏ các protein không bám hoặc bám không đặc hiệu (Hình 6, giếng 3). Mẫu chứa protein mục tiêu bám với SiO<sub>2</sub> sau khi dung ly bằng MgCl<sub>2</sub> hiện diện một vạch của protein mục tiêu và không xuất hiện vạch protein tạp khác (Hình 6, giếng 5), kết luận được rằng đã tinh sạch thành công Protein A-L2 bằng hạt SiO<sub>2</sub>. Đối với giếng 6, vạch protein mục tiêu xuất hiện đậm hơn so với giếng 5, chứng tỏ sự dung ly protein chưa tối ưu, hiệu suất tinh sạch chưa cao, thế ion chưa đủ lớn để tạo lực ion mạnh để có thể giải phóng protein mục tiêu ra khỏi SiO<sub>2</sub> hoàn toàn. Như vậy, muốn tách protein mục tiêu ra khỏi SiO<sub>2</sub> hoàn toàn thì cần chất có hoạt tính dung ly mạnh như HCl 1N (Ikeda et al., 2010) nhưng sẽ làm ảnh hưởng đến hoạt tính của protein sau khi tinh sạch, nên đối với phương pháp này, lượng protein thu ở mức tương đối, nhưng vẫn đảm bảo protein có độ tinh khiết cao. Điều này cũng cho thấy rõ khả năng bám rất mạnh của Protein A-L2 với hạt SiO<sub>2</sub> trong điều kiện nồng độ muối cao và chất tẩy rửa mạnh (Taniguchi et al., 2007; Ikeda et al., 2010)

So với phương pháp tinh sạch bằng cột HisTrap HP, phương pháp tinh sạch bằng hạt SiO<sub>2</sub> đơn giản hơn, nhanh chóng và độ tinh sạch protein tương đối không lẫn các protein tạp khác (Ikeda et al., 2010). Nghiên cứu này so với phương pháp đã thực hiện trước đây, thì Protein A-L2 thu được sau dung ly vẫn đảm bảo về độ tinh sạch, nhưng lượng protein thu được còn bị hạn chế (Ikeda et al., 2010).



**Hình 6. Kết quả đánh giá độ tinh sạch Protein A-L2 tái tổ hợp bằng SDS-PAGE kết hợp nhuộm bạc**

*M*, thang protein; 1, dịch protein tồng; 2, dịch nổi protein sau khi bám hạt SiO<sub>2</sub>; 3, dịch nổi sau khi rửa; 4, hạt SiO<sub>2</sub> trước khi dung ly; 5, Protein A-L2 sau khi dung ly; 6, hạt SiO<sub>2</sub> sau khi dung ly

#### 4. KẾT LUẬN

Cấu trúc thành công vector tái tổ hợp pET22b-proAx1-L2 mã hóa cho Protein A-L2; tạo thành công dòng tế bào E. coli BL21(DE3) mang plasmid pET22b-proAx1-L2 có khả năng biểu hiện Protein A-L2 tái tổ hợp ở pha tan và thu nhận được Protein A-L2 bằng hạt SiO<sub>2</sub>. Tuy nhiên, bước dung ly protein bằng MgCl<sub>2</sub> chưa được tối ưu nên hiệu suất thu hồi chưa cao, do đó, cần tiến hành thêm thí nghiệm để xác định nồng độ ion dung ly hợp lý,

mang lại hiệu suất thu hồi tối đa, làm tiền đề cho việc tinh sạch protein tái tổ hợp bằng hạt SiO<sub>2</sub> ở quy mô lớn. Mặt khác, việc khó dung ly còn cho thấy khả năng bám của Protein A-L2 với hạt SiO<sub>2</sub> rất mạnh, tức khi ứng dụng trong thực tế ở những điều kiện có nồng độ muối cực đoạn thì cấu trúc này vẫn giữ được sự ổn định. Với những kết quả có được trong nghiên cứu này, có thể hướng đến việc ứng dụng xây dựng hệ thống cảm biến sinh học, hay phát triển hệ thống vận chuyển thuốc nhắm trúng đích sau này.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cha, T., Guo, A., & Zhu, X. Y. J. P. (2005). Enzymatic activity on a chip: the critical role of protein orientation. *Proteomics*, 5(2), 416-419. <https://doi.org/10.1002/pmic.200400948>
- Fuchs, S. M., & Raines, R. T. J. P. S. (2005). Polyarginine as a multifunctional fusion tag. *Protein science*, 14(6), 1538-1544. <https://doi.org/10.1110/ps.051393805>
- Graille, M., Stura, E. A., Corper, A. L., Sutton, B. J., Taussig, M. J., Charbonnier, J.-B., & Silverman, G. J. J. P. o. t. N. A. o. S. (2000). Crystal structure of a Staphylococcus aureus protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(10), 5399-5404.
- Ikeda, T., Ninomiya, K.-i., Hirota, R., Kuroda, A. J. P. e., & purification. (2010). Single-step affinity purification of recombinant proteins using the silica-binding Si-tag as a fusion partner. *Protein expression and purification*, 71(1), 91-95. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.12.009>
- Mai, Q.-G., Vo-Nguyen, H.-V., Tran, T. L., & Tran-Van, H. J. J. o. A. B. R. (2022). All-in-One Molecular Cloning as a New Gene Manipulation Method. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 9(1), 511-515. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5399>
- Manat, Y., Shustov, A., Evttehova, E., & Eskendirova, S. (2016). Expression, purification and immunochemical characterization of recombinant OMP28 protein of Brucella species. *Open Veterinary Journal*, 6(2), 71-77. <https://doi.org/10.4314/ovj.v6i2.1>
- Nguyen, T.-T., Vo-Nguyen, H.-V., & Tran-Van, H. (2021). Prokaryotic expression of chimeric GFP-hFc protein as a potential immune-based tool. *Molecular Biology Research Communications*, 10(3), 105.
- Rahman, W. N., Corde, S., Yagi, N., Abdul Aziz, S. A., Annabell, N., & Geso, M. (2014). Optimal energy for cell radiosensitivity enhancement by gold nanoparticles using synchrotron-based monoenergetic photon beams. *Int J Nanomedicine*, 9, 2459-2467. doi:10.2147/IJN.S59471 <https://doi.org/10.2147/IJN.S59471>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. J. F. i. m. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Taniguchi, K., Nomura, K., Hata, Y., Nishimura, T., Asami, Y., Kuroda, A. J. B., & Bioengineering. (2007). The Si-tag for immobilizing proteins on a silica surface. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(6), 1023-1029. <https://doi.org/10.1002/bit.21208>