(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) **2-0003964**

(51) **C07K 14/00** 2022.01

(13) **Y**

(21) 2-2023-00252
(22) 18/05/2023
(45) 25/02/2025 443
(43) 25/08/2023 425
(73) Viện Nghiên cứu hệ gen - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội
(72) VÕ THỊ BÍCH THỦY (VN); NGHIÊM NGỌC MINH (VN); VŨ MINH THƯƠNG (VN); BÙI THÙY LINH (VN); NGUYỄN BẢO TRÂM (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT KHÁNG NGUYÊN TÁI TỔ HỢP DCP CỦA GEN DES-GAMMA-CARBOXY PROTHROMBIN

(21) 2-2023-00252

(57) Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất kháng nguyên tái tổ hợp DCP của gen *Des-gamma-carboxy-prothrombin* có thể ứng dụng trong chế tạo kit chẩn đoán ung thư gan sớm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất kháng nguyên tái tổ hợp DCP của gen *Des-gamma-carboxy prothrombin* dùng để ứng dụng trong chế tạo kit chẩn đoán ung thư gan sớm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ung thư nguyên phát (tế bào ung thư hình thành từ trong gan) là một trong ba bệnh lý ung thư gây tử vong hàng đầu ở 46 nước trên thế giới. Và một trong số 5 nguyên nhân ở gần 100 quốc gia vào năm 2020 khiến nhiều người tử vong vì ung thư. Theo cơ quan nghiên cứu Ung thư Quốc tế (IARC) thuộc Tổ chức Y tế thế giới (WHO) ước tính có khoảng 905.700 người được chẩn đoán ung thư gan và 830.200 người chết vì căn bệnh này trên toàn cầu năm 2020. Tỉ lệ tử vong của bệnh lên đến 90% do đa số bệnh nhân phát hiện mắc ung thư gan ở giai đoạn muộn, khả năng chữa trị đã không còn cao. Theo Globocan 2020, số liệu thống kê cho thấy tỉ lệ mắc mới ung thư gan tại Việt Nam mỗi năm là 26.418 ca, chiếm 14.5% tổng số ung thư. Với 25.272 ca tử vong do ung thư gan, dẫn đầu và chiếm 21% tổng số tử vong do ung thư, gấp 3.8 lần tổng số tử vong do tai nạn giao thông năm 2020 (6.700 ca). Tại Việt Nam theo thống kê của Bộ Y tế, 90% số ca ung thư gan là ung thư biểu mô tế bào gan (Hepatocellular Carcinoma – HCC).

Hiện nay, các "tiêu chuẩn vàng" bằng các phương pháp lâm sàng như: chụp cắt lớp vi tính, sinh thiết gan, siêu âm chẩn đoán hình ảnh và xác định các chỉ thị sinh học như α-fetoprotein (AFP) dùng để chẩn đoán ung thư gan. Tuy nhiên, vẫn có nhiều hạn chế do các xét nghiệm này chỉ phát hiện được bệnh vào giai đoạn muộn, làm giảm khả năng sống sót của bệnh nhân ung thư gan. Vì vậy, việc nghiên cứu về tác nhân gây bệnh, cơ chế và phương pháp chẩn đoán, phát hiện sớm ung thư gan có vai trò quan trọng đối với việc giảm tỉ lệ mắc và tử vong của loại ung thư này. Nhu cầu đặt ra là phải nghiên cứu các chỉ thị sinh học mới giúp chẩn đoán, phát hiện ung thư gan ở giai đoạn sớm.

Ngày nay, chỉ thị sinh học là một trong những công cụ quan trọng nhất để phát hiện sớm ung thư, xác định chính xác sự tiến triển của bệnh, tiên lượng và theo dõi điều trị ung thư nhằm kéo dài thời gian sống, giảm tỷ lệ tử vong ở bệnh nhân ung thư. Đối với

nghiên cứu ung thư gan, các phương pháp trên đều đã được áp dụng để tìm ra các chỉ thị phân tử, bao gồm cả ADN và protein, đặc biệt là các kháng thể đặc hiệu.

Kháng thể đơn dòng (monoclonal antibodies - mAb) được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu y sinh học cơ bản, trong chẩn đoán bệnh và điều trong điều trị các bệnh như nhiễm trùng và đặc biệt là ung thư. Việc sử dụng hệ thống dò tìm dựa vào kháng thể để nhận dạng các kháng nguyên ung thư là một trong ba cách tiếp cận được áp dụng rộng rãi để nghiên cứu các chỉ thị sinh học phục vụ cho việc chẩn đoán phân tử, phát hiện ung thư sớm. Để thành công tạo ra kháng thể đơn dòng thì việc chọn và tạo ra kháng nguyên quyết định rất lớn, đồng thời cũng quyết định hiệu quả ứng dụng của sản phẩm tạo thành. Đến nay, ngoài AFP đã được xác định có giá trị thì còn có nhiều chỉ thị sinh học khác đã được nghiên cứu để chẩn đoán HCC, trong đó có DCP.

Des-gamma-carboxy prothrombin (DCP) là một protein bất thường được tạo ra bởi sự gây thiếu vitamin K của prothrombin, một yếu tố đông máu được sản xuất bởi gan. DCP có thể được sản xuất bởi các khối u gan và mức độ thường tăng lên khi bị HCC. Nồng độ DCP bình thường là 0 – 7,5ng/ml. Với giá trị cắt là 25ng/ml thì xét nghiệm DCP có độ nhạy là 87% và độ đặc hiệu là 85% trong chẩn đoán HCC. Nhiều nghiên cứu cho thấy sự tăng DCP thường phản ánh tình trạng của bệnh, kích thước khối u, sự xâm lấn tĩnh mạch cửa. Có nhiều các nghiên cứu khẳng định sự kết hợp của DCP và AFP làm tăng rõ rệt độ đặc hiệu trong chẩn đoán sớm HCC.

Với chỉ thị phân tử đã chọn, việc xây dựng quy trình sản xuất các protein này như các kháng nguyên cho các bước nghiên cứu tiếp theo là vô cùng quan trọng. Do vậy, định hướng nghiên cứu và ứng dụng kỹ thuật công nghệ sinh học phân tử trong việc sản xuất tạo kháng nguyên tái tổ hợp DCP phục vụ cho việc chẩn đoán ung thư gan sớm có ý nghĩa và giá trị y tế rất lớn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất kháng nguyên tái tổ hợp DCP của gen *Des-gamma-carboxy prothrombin* dùng để ứng dụng trong chế tạo kit chẩn đoán ung thư gan sớm, trong đó kháng nguyên này có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế này đề xuất tạo kháng nguyên tái tổ hợp DCP của gen *DCP* có trình tự SEQ ID NO.1, gồm 93 axit amin và có kích thước 10,73 kDa.

Kháng nguyên tái tổ hợp DCP được tinh sạch bằng hệ thống cột resin gắn nickel có ai lực cao với các protein chứa 6 gốc histindin, việc gắn liên kết hình thành thông qua liên kết giữa ion Ni^{2+} và His trong phân tử protein.

Kháng nguyên này được bảo quản trong dung dịch muối đệm phosphat (phosphate buffer salin - PBS); độ pH=7,4 có thành phần như sau:

NaCl: 8 g

KCl: 0,2 g

$Na_2HPO_4.12H_2O$: 3,58 g

KH_2PO_4: 0,24 g

1000 ml nước cất

Kháng nguyên theo sáng chế được tạo ra bằng quy trình được thể hiện dưới đây:

Cặp mồi oligonucleotit dùng nhân đoạn gen mã hoá protein DCP được thiết kế dựa trên gen *DCP*.

Các phương pháp để tổng hợp cặp mồi đã biết và được mô tả trong rất nhiều tài liệu. Có thể tổng hợp bằng phương pháp sinh học và hoá học. Đối với cặp mồi có trình tự ngắn của sáng chế này thì dùng phương pháp tổng hợp hoá học là kinh tế hơn so với phương pháp tổng hợp sinh học.

Cặp mồi được thiết kế có % GC khá tương đồng với nhau để đảm bảo nhiệt độ bắt cặp của chúng với ADN đích. Cặp mồi này được thiết kế để nhân đoạn gen đích *DCP* (mã hoá protein DCP) có kích thước 267 bp.

Bảng 1. Trình tự và các thông số cần thiết của cặp mồi

Gen đích	Cặp mồi	Trình tự cặp mồi	Độ dài	Kích thước gen đích
DCP	DCP-F	CATATGGGGGATTTTGGATATTGTGA	26 nucleotit	267 bp
	DCP-R	CTCGAGATCGATATAGGACTCCAG	24 nucleotit	

Thiết kế vector pJET1.2 mang gen *DCP*

Sản phẩm PCR có độ dài 267 bp khuếch đại trên gen *DCP* được tiến hành tối ưu, được tinh khiết, sau đó được chuyển vào plasmid. Plasmid được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5α theo phương pháp sốc nhiệt 42°C trong 45 giây, giúp ADN dễ dàng bám dính vào màng tế bào, sự thay đổi nhiệt độ đột ngột khi sốc nhiệt sẽ tác động lên cấu trúc thành tế bào, tạo điều kiện cho ADN ngoại lai đi vào trong tế bào. Tế bào được nuôi trên môi trường LB lỏng, nuôi lắc 200 v/p ở 37°C, 1 giờ. Sau đó cấy trải trên đĩa thạch LB Aga (NaCl: 4 g; Trypton: 4 g; Cao nấm men: 2 g; Aga: 8 g; Định mức nước cất đến 400 ml) có bổ sung ampicillin 37°C qua đêm.

Thiết kế vector biểu hiện pET22b+ mang gen *DCP*

- Chuẩn bị vector biểu hiện pET22b+

Vector pET22b+ là vector biểu hiện mạnh có kích thước 5493 bp, mang một trình tự pelB signal ở đầu N' tại vị trí 224 đến 289, và His-tag ở đầu C' tại vị trí 140 đến 157. Vector pET22b+ chứa promotơ T7 có nhiệm vụ khởi đầu quá trình phiên mã. Trình tự pelB signal và His-tag có chức năng cung cấp điểm khởi đầu dịch mã và kết thúc quá trình dịch mã cũng như tinh sạch protein bằng liên kết ái lực. Vector biểu hiện ở mức độ dịch mã so với trình tự rbs (ribosome binding site-vị trí liên kết ribosom) được thiết kế ở giữa vị trí promotơ và đoạn gen được chèn vào. Biểu hiện protein tái tổ hợp được thực hiện bằng cách xen đoạn ADN đích vào vùng đa tách dòng (Multiplex Cloning Site – MCS) của vector biểu hiện.

- Xử lý enzym giới hạn trên pET22b+, DCP

Tiến hành cắt mở vòng plasmid chứa vector pET22b+ đã tách từ *E.coli* DH5α và plasmid chứa gen *DCP* bằng hai loại enzym cắt giới hạn là *Nde*I và *Xho*I ủ trong 2-5 giờ ở 37°C.

- Gắn đoạn gen đích vào vector biểu hiện pET22b+

Sau khi xử lý plasmid bằng enzym cắt giới hạn, tiến hành phản ứng nối ghép gen *DCP* vào vector biểu hiện pET22b+ bằng enzym nối T4 ligaza. Sản phẩm ghép nối được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5α, sau đó chọn lọc khuẩn lạc biến nạp trên môi trường có chứng kháng sinh chọn lọc ampicillin. Khuẩn lạc đã chọn được đem kiểm tra PCR với mồi đặc hiệu DCP đã thiết kế.

Biến nạp vector tái tổ hợp pET22b+DCP vào *Escherichia coli* chủng BL21 (DE3)

E.coli BL21 (DE3) là chủng vi khuẩn hiệu biểu hiện gen thường được sử dụng khi biểu hiện 1 protein lạ và vật chủ phù hợp cho biểu hiện protein khi dùng vector biểu hiện có chứa promotơ T7 như vector pET22b+. Chủng vi khuẩn *E.coli* BL21 đã được biến đổi để tăng cường khả năng biểu hiện protein ngoại lai, đây là chủng phù hợp với đối tượng và mục đích nghiên cứu của đề tài. Chúng tôi tiến hành biến nạp sản phẩm tái tổ hợp vào tế bào khả biến *E.coli* BL21 (DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt.

Kiểm tra sự biểu hiện gen *DCP*

Gen *DCP* trong vector biểu hiện hoạt động dưới sự điều khiển của T7 lac promotơ và được kiểm soát chặt chẽ bởi chất cảm ứng IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside) có trong môi trường. Do đó, để nghiên cứu sự biểu hiện của protein tái tổ hợp, vi khuẩn sau khi biến nạp thành công được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng có kháng sinh ampicillin và chất cảm ứng IPTG.

Chủng tái tổ hợp được nuôi trong môi trường LB lỏng (NaCl: 2 g; Trypton: 2 g; Cao nấm men: 1 g; Định mức nước cất đến 200 ml) có bổ sung kháng sinh ampocillin 100 µg/ ml (LBA) ở 37°C, lắc 200 vòng/ phút qua đêm để hoạt hoá. Sau đó chuyển 2% dịch tế bào nuôi cấy qua đêm vào môi trường LBA mới, tiếp tục nuôi lắc ở điều kiện 37°C, 200 vòng/ phút đến khi OD_{600} (mật độ tế bào) đạt 0,5-0,8. Bổ sung chất cảm ứng IPTG đến nồng độ cuối cùng là 0.1mM/ mL và tiếp tục nuôi lắc 200 vòng/ phút ở 25°C qua đêm để cảm ứng tế bào tổng hợp protein ngoại lai. Ly tâm dịch nuôi ở 4000 vòng/phút trong 20 phút thu sinh khối tế bào.

Tinh sạch protein tái tổ hợp DCP

Thiết kế vector biểu hiện pET22b+DCP, protein đích được tổng hợp sẽ nối thêm 6 axit amin Histidin ở phần -COOH. Đây là một đặc điểm thuận lợi cho việc tinh sạch sản phẩm, phương pháp tinh sạch bằng cột Histag dựa vào liên kết ái lực giữa ion niken (Ni^{2+}) với vòng imidazol của histidin. Khi các axit amin histidin ở gần nhau thì liên kết giữa chúng với các ion niken càng mạnh. Protein tái tổ hợp do gen mã hoá có đuôi His-tag với 6 axit amin histidin liên tục sẽ liên kết đặc hiệu với ion niken. Các phân tử protein trong tế bào được tổng hợp do không có đuôi His-tag sẽ không gắn được với ion niken. Mặt khác các ion niken trong cột lại được liêm kết với các hạt Sepharose bằng một phức càng cua nên protein tái tổ hợp sẽ không bị rửa trôi bằng các đệm rửa như các protein khác. Protein tái tổ hợp được giữ lại trên cột sẽ được tách ra khi cho qua dung dịch có chứa nồng độ imidazol thích hợp.

Quy trình theo sáng chế được trình bày một cách cụ thể như dưới đây:

- Nhân đoạn gen đích *Des-gamma-carboxy prothrombin* mã hoá protein DCP có kích thước 267 bp bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi DCP-F được đề cập trong SEQ ID NO: 2 và DCP-R được đề cập trong SEQ ID NO: 3, tinh sạch, thu được sản phẩm PCR nhân đoạn gen đích *Des-gamma-carboxy prothrombin*;

- Thiết kế vectơ pJET1.2 mang gen *Des-gamma-carboxy prothrombin:*

Sản phẩm PCR nhân đoạn gen đích *Des-gamma-carboxy prothrombin* được chuyển vào plasmid pJET1.2;

Plasmid pJET1.2 thu được được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5α theo phương pháp sốc nhiệt 42°C trong 45 giây;

Nuôi tế bào sau biến nạp trên môi trường LB lỏng, nuôi lắc 200 vòng/phút ở 37°C trong 1 giờ;

Sau đó cấy trải trên đĩa thạch LB aga có thành phần gồm NaCl: 4 g, trypton: 4 g, cao nấm men: 2 g, aga: 8 g và định mức nước cất đến 400 ml, có bổ sung ampicillin, ở 37°C qua đêm;

- Thiết kế vectơ biểu hiện pET22b+ mang gen *Des-gamma-carboxy prothrombin:*

Tiến hành cắt mở vòng plasmid chứa vectơ pET22b+ và plasmid chứa gen *Des-gamma-carboxy prothrombin* đã tách từ *E.coli* DH5α bằng hai loại enzym cắt giới hạn là *Nde*I và *Xho*I ủ trong 2-5 giờ ở 37°C;

Tiến hành phản ứng nối ghép gen *Des-gamma-carboxy prothrombin* vào vectơ biểu hiện pET22b+ bằng enzym nối T4 ligaza;

Sản phẩm ghép nối được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5α, sau đó chọn lọc khuẩn lạc biến nạp trên môi trường có chứng kháng sinh chọn lọc ampicillin;

Khuẩn lạc đã chọn được đem kiểm tra PCR với mồi đặc hiệu DCP gồm DCP-F được đề cập trong SEQ ID NO: 2 và DCP-R được đề cập trong SEQ ID NO: 3;

Thu vectơ tái tổ hợp pET22b+DCP từ khuẩn lạc biến nạp thành công;

Biến nạp vectơ tái tổ hợp pET22b+DCP vào *Escherichia coli* chủng BL21 (DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt;

Nuôi *E. coli* chủng BL21 (DE3) sau biến nạp trong môi trường LB lỏng có thành phần NaCl: 2 g; trypton: 2 g; cao nấm men: 1 g và định mức nước cất đến 200 ml, có bổ sung kháng sinh ampicillin 100 µg/ ml (LBA) ở 37°C, lắc 200 vòng/ phút qua đêm để hoạt hoá;

Chuyển 2% dịch tế bào nuôi cấy qua đêm vào môi trường LBA mới, tiếp tục nuôi lắc ở điều kiện 37°C, 200 vòng/ phút đến khi mật độ tế bào OD_{600} đạt 0,5-0,8, bổ sung chất cảm ứng isopropyl-β-D-thiogalactosit (isopropyl-β-D-thiogalactoside - IPTG) đến nồng độ cuối cùng là 0,1mM/mL và tiếp tục nuôi lắc 200 vòng/ phút ở 25°C qua đêm để cảm ứng tế bào tổng hợp protein ngoại lai;

Ly tâm dịch nuôi ở 4000 vòng/phút trong 20 phút thu sinh khối tế bào;

- Tinh sạch thu kháng nguyên tái tổ hợp DCP của gen *Des-gamma-carboxy prothrombin*:

Hòa tan sinh khối tế bào trong dung dịch PBS 1X, pH 7,4, bổ sung enzym lysozym và ủ đá trong 30 phút, siêu âm phá vỡ sinh khối tế bào, ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút, hút bỏ dịch, hòa tan cặn trong dung dịch imidazol 10 mM, thu dịch protein thô;

Thực hiện sắc ký ái lực sử dụng cột Niken-Sepharose để tinh sạch dịch protein thô, bổ sung dung dịch imidazol 10 mM cho qua cột, rửa giải bằng dung dịch imidazol 25 mM để giữ protein mục tiêu trên cột và loại bỏ protein không đặc hiệu, sau đó giải phóng protein mục tiêu từ cột bằng dung dịch imidazol 250 mM, thu được kháng nguyên tái tổ hợp DCP của gen *Des-gamma-carboxy prothrombin.*

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Des-gamma-carboxy prothrombin (DCP) là một protein bất thường được tạo ra bởi sự gây thiếu vitamin K của prothrombin, một yếu tố đông máu được sản xuất bởi gan. DCP có thể được sản xuất bởi các khối u gan và mức độ thường tăng lên khi bị HCC. Giúp phát hiện và chẩn đoán ung thư sớm, giảm thiểu tỷ lệ tử vong của các bệnh nhân ung thư gan do HCC. Định hướng nghiên cứu và ứng dụng kỹ thuật công nghệ sinh học phân tử trong việc sản xuất tạo kháng nguyên tái tổ hợp gen *DCP* phục vụ cho việc chẩn đoán ung thư gan sớm là một hướng phát triển có ý nghĩa với ngành y tế Việt Nam.

Nhóm nghiên cứu tại Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tiến hành nghiên cứu tạo kháng nguyên protein tái tổ hợp DCP. Đồng thời sử dụng kháng nguyên protein tái tổ hợp DCP này làm tiền đề tạo bộ kit phát hiện ung thư gan sớm, nhằm phục vụ chẩn đoán ung thư giai đoạn sớm cho bệnh nhân, tăng tỉ lệ chữa bệnh và giảm tỉ lệ tử vong do ung thư gan.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất kháng nguyên tái tổ hợp DCP của gen *Des-gamma-carboxy prothrombin* có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 bao gồm các bước:

- Nhân đoạn gen đích *Des-gamma-carboxy prothrombin* mã hoá protein DCP có kích thước 267 bp bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi DCP-F được đề cập trong SEQ ID NO: 2 và DCP-R được đề cập trong SEQ ID NO: 3, tinh sạch, thu được sản phẩm PCR nhân đoạn gen đích *Des-gamma-carboxy prothrombin*;

- Thiết kế vectơ pJET1.2 mang gen *Des-gamma-carboxy prothrombin:*

Sản phẩm PCR nhân đoạn gen đích *Des-gamma-carboxy prothrombin* được chuyển vào plasmid pJET1.2;

Plasmid pJET1.2 thu được được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5α theo phương pháp sốc nhiệt 42°C trong 45 giây;

Nuôi tế bào sau biến nạp trên môi trường LB lỏng, nuôi lắc 200 vòng/phút ở 37°C trong 1 giờ;

Sau đó cấy trải trên đĩa thạch LB aga có thành phần gồm NaCl: 4 g, trypton: 4 g, cao nấm men: 2 g, aga: 8 g và định mức nước cất đến 400 ml, có bổ sung ampicillin, ở 37°C qua đêm;

- Thiết kế vectơ biểu hiện pET22b+ mang gen *Des-gamma-carboxy prothrombin:*

Tiến hành cắt mở vòng plasmid chứa vectơ pET22b+ và plasmid chứa gen *Des-gamma-carboxy prothrombin* đã tách từ *E.coli* DH5α bằng hai loại enzym cắt giới hạn là *Nde*I và *Xho*I ủ trong 2-5 giờ ở 37°C;

Tiến hành phản ứng nối ghép gen *Des-gamma-carboxy prothrombin* vào vectơ biểu hiện pET22b+ bằng enzym nối T4 ligaza;

Sản phẩm ghép nối được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5α, sau đó chọn lọc khuẩn lạc biến nạp trên môi trường có chứng kháng sinh chọn lọc ampicillin;

Khuẩn lạc đã chọn được đem kiểm tra PCR với mồi đặc hiệu DCP gồm DCP-F được đề cập trong SEQ ID NO: 2 và DCP-R được đề cập trong SEQ ID NO: 3;

Thu vectơ tái tổ hợp pET22b+DCP từ khuẩn lạc biến nạp thành công;

Biến nạp vectơ tái tổ hợp pET22b+DCP vào *Escherichia coli* chủng BL21 (DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt;

Nuôi *E. coli* chủng BL21 (DE3) sau biến nạp trong môi trường LB lỏng có thành phần NaCl: 2 g; trypton: 2 g; cao nấm men: 1 g và định mức nước cất đến 200 ml, có bổ

sung kháng sinh ampicillin 100 µg/ ml (LBA) ở 37°C, lắc 200 vòng/ phút qua đêm để hoạt hoá;

Chuyển 2% dịch tế bào nuôi cấy qua đêm vào môi trường LBA mới, tiếp tục nuôi lắc ở điều kiện 37°C, 200 vòng/ phút đến khi mật độ tế bào OD_{600} đạt 0,5-0,8, bổ sung chất cảm ứng isopropyl-β-D-thiogalactosit (isopropyl-β-D-thiogalactoside - IPTG) đến nồng độ cuối cùng là 0,1mM/mL và tiếp tục nuôi lắc 200 vòng/ phút ở 25°C qua đêm để cảm ứng tế bào tổng hợp protein ngoại lai;

Ly tâm dịch nuôi ở 4000 vòng/phút trong 20 phút thu sinh khối tế bào;

- Tinh sạch thu kháng nguyên tái tổ hợp DCP của gen *Des-gamma-carboxy prothrombin*:

Hòa tan sinh khối tế bào trong dung dịch muối đệm phosphat PBS 1X, pH 7,4, bổ sung enzym lysozym và ủ đá trong 30 phút, siêu âm phá vỡ sinh khối tế bào, ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút, hút bỏ dịch, hòa tan cặn trong dung dịch imidazol 10 mM, thu dịch protein thô;

Thực hiện sắc ký ái lực sử dụng cột Niken-Sepharose để tinh sạch dịch protein thô, bổ sung dung dịch imidazol 10 mM cho qua cột, rửa giải bằng dung dịch imidazol 25 mM để giữ protein mục tiêu trên cột và loại bỏ protein không đặc hiệu, sau đó giải phóng protein mục tiêu từ cột bằng dung dịch imidazol 250 mM, thu được kháng nguyên tái tổ hợp DCP của gen *Des-gamma-carboxy prothrombin.*

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Nghiên cứu hệ gen – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<120> QUY TRÌNH SẢN XUẤT KHÁNG NGUYÊN TÁI TỔ HỢP DCP CỦA GEN *DES-GAMMA-CARBOXY PROTHROMBIN*

<160> 3

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 93

<212> Axit amin

<213> Nhân tạo

<400> 1

```
Asp Ile His Met Gly Asp Phe Gly Tyr Cys Asp Leu Asn Tyr Cys
1               5                  10                  15

Glu Glu Ala Val Glu Glu Glu Thr Gly Asp Gly Leu Asp Glu Asp
            20                  25                  30

Ser Asp Arg Ala Ile Glu Gly Arg Thr Ala Thr Ser Glu Tyr Gln
        35                  40                  45

Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp Cys
    50                  55                  60

Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
65                  70                  75

Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Leu Glu His His His
            80                  85                  90

His His His
```

<210> 2

<211> 26

<212> nucleotit

<213> Nhân tạo

<400> 2

CATATGGGGG ATTTTGGATA TTGTGA 26

<210> 3

<211> 24

<212> nucleotit

<213> Nhân tạo

<400> 3

CTCGAGATCG ATATAGGACT CCAG 24