



(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)



2-0003965

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

(13) **Y**

(21) 2-2023-00253

(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 MINH ĐỨC (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT KHÁNG NGUYÊN TÁI TỔ HỢP TXN CỦA GEN
THIOREDOXIN

(21) 2-2023-00253

(57) Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất kháng nguyên tái tổ hợp TXN của gen *Thioredoxin* 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 TXN của gen *Thioredoxin* 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. Tỷ 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 tỷ 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 tỷ 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 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 Thioredoxin.

Thioredoxin là một protein oxy hoá khử được tìm thấy ở cả tế bào nhân sơ và tế bào nhân chuẩn. Nó đóng một vai trò trong nhiều quá trình sinh học quan trọng, bao gồm cả tín hiệu oxy hoá khử. Ở người, độc tố Thioredoxin được mã hoá bởi gen *TXN* và *TXN2*. Chúng thường có xu hướng tăng cường sự biểu hiện ở một số loại ung thư như gan, phổi, đại tràng, vú, cổ tử cung, dạ dày và tuyến tụy. Sự biểu hiện vượt ngưỡng của chúng có liên quan đến sự tăng sinh của các tế bào ung thư, ức chế quá trình chết theo chu trình, có liên quan đến sự xâm lấn của khối u và tiên lượng xấu ở bệnh nhân. Trong chẩn đoán HCC ung thư gan, Thioredoxin được coi là một marker bổ sung tiềm năng cho AFB, đặc biệt là trong các chẩn đoán sớm.

Với chỉ thị phân tử đã chọn, việc tạo 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 tạo kháng nguyên tái tổ hợp *TXN* của gen *Thioredoxin* 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 *TXN* của gen *Thioredoxin* 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 *TXN* của gen *Thioredoxin* có trình tự SEQ ID NO.1, gồm 105 axit amin và có kích thước 11,78 kDa.

Kháng nguyên tái tổ hợp TXN được tinh sạch bằng hệ thống cột resin gắn nickel có ái lực cao với các protein chứa 6 gốc histidin, 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 phosphat buffer salin (PBS); độ pH=7,4 có thành phần như sau:

NaCl: 8 g

KCl: 0,2 g

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$: 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 môi oligonucleotit dùng nhân đoạn gen mã hoá protein TXN được thiết kế dựa trên gen *Thioredoxin*.

Các phương pháp để tổng hợp cặp môi 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 môi 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 môi được thiết kế có % GC khá tương đồng với nhau để đảm bảo nhiệt độ bắt cặp của chúng với ADN đích. Cặp môi này được thiết kế để nhân đoạn gen đích *Thioredoxin* (mã hoá protein TXN) có kích thước 309 bp.

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

Gen đích	Cặp môi	Trình tự cặp môi	Độ dài	Kích thước gen đích
<i>Thioredoxin</i>	TXN-F	CATATGATAGAGTCAAAAAC AGCATTTC AAG	31 nucleotit	309 bp
	TXN-R	CTCGAGCGCCTCCAGCTTTT	20 nucleotit	

Thiết kế vector pJET1.2 mang gen *Thioredoxin*

Sản phẩm PCR có độ dài 309 bp khuếch đại trên gen *Thioredoxin* 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* DH5 α 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 *Thioredoxin*

- 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 promoter 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 ribosome) được thiết kế ở giữa vị trí promoter 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+, TXN

Tiến hành cắt mở vòng plasmid chứa vector pET22b+ đã tách từ *E.coli* DH5 α và plasmid chứa gen *Thioredoxin* bằng hai loại enzym cắt giới hạn là *NdeI* và *XhoI* 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 *Thioredoxin* vào vector biểu hiện pET22b+ bằng enzym nối T4 ligaza. Sản phẩm ghép nối được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 α , sau đó chọn lọc khuẩn lạc biến nạp trên môi trường có chứa kháng sinh chọn lọc ampicillin. Khuẩn lạc đã chọn được đem kiểm tra PCR với môi đặc hiệu TXN đã thiết kế.

Biến nạp vector tái tổ hợp pET22b+TXN 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 promoter 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 *Thioredoxin*

Gen *Thioredoxin* trong vector biểu hiện hoạt động dưới sự điều khiển của T7 lac promoter 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 ampicillin 100 μ g/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 OD₆₀₀ (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 TXN

Thiết kế vector biểu hiện pET22b+TXN, 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 liên kết với các hạt Sepharose bằng một phức càng của 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 *Thioredoxin* mã hoá protein TXN có kích thước 309 bp bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi TXN-F được đề cập trong SEQ ID NO: 2 và TXN-

R được đề cập trong SEQ ID NO: 3, tinh sạch, thu được sản phẩm PCR nhân đoạn gen đích *Thioredoxin*;

- Thiết kế vector pJET1.2 mang gen *Thioredoxin*:

Sản phẩm PCR nhân đoạn gen đích *Thioredoxin* được chuyển vào plasmid pJET1.2;

Plasmid pJET1.2 thu được được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 α 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 agar có thành phần gồm NaCl: 4 g, trypton: 4 g, cao nấm men: 2 g, agar: 8 g và định mức nước cất đến 400 ml, có bổ sung ampicillin, ở 37°C qua đêm;

- Thiết kế vector biểu hiện pET22b+ mang gen *Thioredoxin*:

Tiến hành cắt mở vòng plasmid chứa vector pET22b+ và plasmid chứa gen *Thioredoxin* đã tách từ *E.coli* DH5 α bằng hai loại enzym cắt giới hạn là *Nde*I và *Xho*I ở trong 2-5 giờ ở 37°C;

Tiến hành phản ứng nối ghép gen *Thioredoxin* vào vector biểu hiện pET22b+ bằng enzym nối T4 ligaza;

Sản phẩm ghép nối được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 α , sau đó chọn lọc khuẩn lạc biến nạp trên môi trường có chứa kháng sinh chọn lọc ampicillin;

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

Thu vector tái tổ hợp pET22b+TXN từ khuẩn lạc biến nạp thành công;

Biến nạp vector tái tổ hợp pET22b+TXN 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 μ g/ 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 OD₆₀₀ 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 TXN của gen *Thioredoxin*:

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 TXN của gen *Thioredoxin*.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Kiểm tra hiệu quả kháng nguyên tái tổ hợp TXN sau tinh sạch bằng kit ELISA (Human TXN kit ELISA). Protein tái tổ hợp TXN được kiểm tra nồng độ protein, thực hiện phản ứng ELISA theo nguyên tắc kháng thể thương mại sẽ kết hợp với kháng nguyên là protein tái tổ hợp TXN. Các bước tiến hành như sau: Gắn đĩa ELISA 100μl (4μg/ml) protein Theoredoxin tái tổ hợp; rửa đĩa ELISA đã được gắn kháng nguyên bằng dung dịch rửa (PBS + 0,05% Tween 20). Block đĩa ELISA bằng 300 μl dung dịch rửa có bổ sung 5% skim milk; ủ đĩa ELISA trong 1 h ở 37°C; rửa đĩa ELISA bằng dung dịch rửa. Thêm kháng thể đơn dòng (là dịch nuôi cấy tế bào lai tiết kháng thể) vào 100 μl/giếng; ủ đĩa ELISA ở 37° C trong 1h; rửa đĩa ELISA bằng dung dịch rửa. Thêm 100 μl/giếng kháng thể thứ cấp (Horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG, Invitrogen), ủ đĩa ELISA ở 37°C trong 1 h; rửa đĩa ELISA bằng dung dịch rửa. Thêm 100 μl/giếng dung dịch cơ chất hiện màu TMB, ủ đĩa ELISA ở 37° C trong 10 phút, dừng phản ứng bằng cách bổ sung 50 μl HCl 1N vào. Đo giá trị OD 450 (mật độ quang học) bằng đọc ELISA và đánh giá kết quả.

Kết quả cuối cùng trả về chỉ số OD trên 0,5 chứng tỏ có phản ứng kháng nguyên tái tổ hợp TXN với kháng thể thương mại trong phản ứng ELISA.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Thioredoxin là một protein oxy hoá khử được tìm thấy ở cả tế bào nhân sơ và tế bào nhân chuẩn, được coi là một marker bổ sung tiềm năng cho AFB, đặc biệt là trong các

chẩn đoán sớm. 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 *Thioredoxin* 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 TXN. Đồng thời sử dụng kháng nguyên protein tái tổ hợp TXN 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 TXN của gen *Thioredoxin* có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 bao gồm các bước:

- Nhân đoạn gen đích *Thioredoxin* mã hoá protein TXN có kích thước 309 bp bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi TXN-F được đề cập trong SEQ ID NO: 2 và TXN-R được đề cập trong SEQ ID NO: 3, tinh sạch, thu được sản phẩm PCR nhân đoạn gen đích *Thioredoxin*;

- Thiết kế vector pJET1.2 mang gen *Thioredoxin*:

Sản phẩm PCR nhân đoạn gen đích *Thioredoxin* được chuyển vào plasmid pJET1.2;

Plasmid pJET1.2 thu được được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 α 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 vector biểu hiện pET22b+ mang gen *Thioredoxin*:

Tiến hành cắt mở vòng plasmid chứa vector pET22b+ và plasmid chứa gen *Thioredoxin* đã tách từ *E.coli* DH5 α bằng hai loại enzyme cắt giới hạn là *Nde*I và *Xho*I ở trong 2-5 giờ ở 37°C;

Tiến hành phản ứng nối ghép gen *Thioredoxin* vào vector biểu hiện pET22b+ bằng enzyme nối T4 ligaza;

Sản phẩm ghép nối được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 α , sau đó chọn lọc khuẩn lạc biến nạp trên môi trường có chứa kháng sinh chọn lọc ampicillin;

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

Thu vector tái tổ hợp pET22b+TXN từ khuẩn lạc biến nạp thành công;

Biến nạp vector tái tổ hợp pET22b+TXN 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 OD₆₀₀ đạt 0,5-0,8, bổ sung chất cảm ứng isopropyl-β-D-thiogalactoside (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 TXN của gen *Thioredoxin*:

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 TXN của gen *Thioredoxin*.

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 TXN CỦA GEN *Thioredoxin*

<160> 3

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 105

<212> Axit amin

<213> Nhân tạo

<400> 1

Met	Ile	Glu	Ser	Lys	Thr	Ala	Phe	Gln	Glu	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala			
1				5					10					15			
Gly	Asp	Lys	Leu	Val	Val	Val	Asp	Phe	Ser	Ala	Thr	Trp	Cys	Gly			
				20					25					30			
Pro	Cys	Lys	Met	Ile	Lys	Pro	Phe	Phe	His	Ser	Leu	Ser	Glu	Lys			
				35					40					45			
Tyr	Ser	Asn	Val	Ile	Phe	Leu	Glu	Val	Asp	Val	Asp	Asp	Cys	Gln			
				50					55					60			
Asp	Val	Ala	Ser	Glu	Cys	Glu	Val	Lys	Cys	Met	Pro	Thr	Phe	Gln			
				65					70					75			
Phe	Phe	Lys	Lys	Gly	Gln	Lys	Val	Gly	Glu	Phe	Ser	Gly	Ala	Asn			
				80					85					90			
Lys	Glu	Lys	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	His	His	His	His	His	His	End			
				95					100					105			

<210> 2

<211> 31

<212> nucleotit

<213> Nhân tạo

<400> 2

CATATGATAG AGTCAAAAAC AGCATTTC AA G 31

<210> 3

<211> 20

<212> nucleotit

<213> Nhân tạo

<400> 3

CTCGAGCGCC TCCAGCTTTT 20