CẢI THIỆN MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN PROTEIN TÁI TỔ HỢP LTB CỦA *ESCHERICHIA COLI* TRONG TẾ BÀO KHẢ BIẾN *ESCHERICHIA COLI* BL21 (DE3)

Đinh Thị Bích Lân[1], Phùng Thăng Long[2], Đặng Thanh Long[1], Lê Công Thịnh[1], Lê Đức Thạo[1], Lê Quốc Việt[1], Nguyễn Thị Bình[1], Đặng Thị Hương[1], Huỳnh Văn Chương[1], Lê Viết Quân[1]

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm cải thiện mức độ biểu hiện protein tái tổ hợp LTB trong tế bào *E. coli* chủng BL21 (DE3) mang gen *eltB* của vi khuẩn *E. coli*. Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường nuôi cấy TB và YJ cho khả năng sinh trưởng tốt nhất của vi khuẩn *E. coli* với tỷ lệ tiếp giống là 2% (OD600 = 0,8), lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ 37ºC sau 9 giờ nuôi cấy. Mức độ biểu hiện của protein dung hợp 6xHis-LTB cho kết quả tốt nhất trên môi trường YJ và HSG trong cùng điều kiện tối ưu (nồng độ chất cảm ứng Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 1,2 mM, lắc 200 vòng/phút, nhiệt độ cảm ứng 25ºC - 35ºC trong thời gian 8 giờ). Sắc ký lọc gel 6xHis cho sản phẩm protein dung hợp 6xHis-LTB có khối lượng phân tử khoảng 35 kDa.

Từ khóa: protein dung hợp, LTB, độc tố, *E. coli*

Enhancing expression of recombinant protein LTB of *Escherichia coli* in competent cells, *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Dinh Thi Bich Lan, Phung Thang Long, Dang Thanh Long, Le Cơng Thinh, Le Duc Thao, Le Quoc Viet, Nguyen Thi Binh , Dang Thi Huong, Huynh Van Chuong, Le Viet Quan

SUMMARY

The study on improvement of the recombinant protein LTB expression level in *E. coli* strain BL21 (DE3) encoding gene *eltB* of *E. coli* was conducted. The studied results showed that TB and YJ media have given the best growth of *E. coli* BL21 (DE3) in comparison with other media in the same 2 % initial seed inoculum size (OD600 = 0.8), shaking 200 rpm at 37^{0}C for 9 hours. The highest level of fusion protein (6xHis-LTB) was obtained from YJ and HSG media in the same optimum culture condition (1.2 mM Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 8 hours at 25^{0}C-35^{0}C). Molecular weight of purified 6xHis-LTB protein from 6xHis affinity chromatography was about 35 kDa.

Keywords: fusion protein, LTB, toxin, *E. coli.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn *Escherichia coli (E. coli)* là nguyên nhân chính gây ra tiêu chảy ở người và động vật do có khả năng tiết ra các loại độc tố gây rối loạn chức năng chuyển hóa nước và muối ở ruột [4]. Các loại độc tố này bao gồm: độc tố chịu nhiệt (heat stable enterotoxin - ST) và độc tố không chịu nhiệt (heat labile enterotoxin - LT). LT có các tiểu phần LTA và LTB, là protein có tính kháng nguyên mạnh, quyết định tới độc lực của nhóm vi khuẩn *E. coli* gây tiêu chảy (ETEC) [3]. Thành phần chính gây độc là tiểu phần LTA. Ngược lại, tiểu phần LTB không gây độc, chức năng chính của chúng là giúp độc tố LT bám lên bề mặt tế bào niêm mạc ruột [4]. Tuy không gây độc nhưng tiểu phần B lại gây đáp ứng miễn dịch khá hiệu quả, do đó, chúng được sử dụng

[1] Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế
[2] Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

làm thành phần chính của các loại vacxin tiểu phần phòng bệnh tiêu chảy do vi khuẩn ETEC gây ra [11]. Kháng thể kháng độc tố có khả năng hạn chế tác hại của độc tố. Vì vậy, nghiên cứu nhằm tạo ra kháng nguyên tái tổ hợp, tạo nguồn nguyên liệu sản xuất kháng thể kháng độc tố, sử dụng trong phòng và trị bệnh do *E. coli* gây ra là cần thiết. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá mức độ biểu hiện protein tái tổ hợp LTB của vi khuẩn *E. coli* mang gen *eltB* trong các môi trường với các điều kiện biểu hiện khác nhau nhằm tìm ra môi trường và điều kiện tối ưu để sản xuất protein tái tổ hợp LTB ở quy mô phòng thí nghiệm.

II. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

- Tế bào *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp có chứa vector pET200/D-TOPO (Invitrogen, USA) mang gen mã hóa protein LTB do chúng tôi tự thiết kế và chế tạo.

- Các loại môi trường nuôi cấy LB, SOB, SOC, TB, YJ, M9ZB, HSG [1], hóa chất dùng để pha các loại môi trường này đều là sản phẩm của hãng Merck, Đức.

- IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) của hãng Biorad, Mỹ.

- Hệ thống gel lọc ProBond™ Purification System Kit của hãng Invitrogen, Mỹ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

* Nuôi cấy vi khuẩn

Chủng *E. coli* BL21(DE3) tái tổ hợp mang gen mã hóa protein LTB của *E. coli* được nuôi cấy trong các bình tam giác, mỗi bình chứa 50 ml một trong các loại môi trường nêu trên có bổ sung kanamycin (50 µg/ml) ở các mức nhiệt độ, thời gian nuôi cấy, tốc độ lắc, nồng độ chất cảm ứng IPTG, mật độ của tế bào tại thời điểm bổ sung chất cảm ứng và thời gian cảm ứng khác nhau, tùy theo từng thí nghiệm cụ thể.

* Thu nhận và tinh sạch kháng nguyên tái tổ hợp

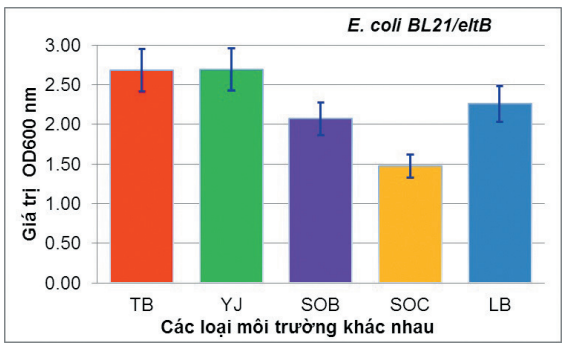
Sau khi nuôi cấy, sinh khối tế bào được thu nhận bằng cách ly tâm 6.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4ºC và tái huyền phù trong TNE (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA) + 1% Triton X-100 + 1 mg/ml lysozyme), ủ trong đá 60 phút, sau đó siêu âm 5 phút và ly tâm 15.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4ºC. Protein tái tổ hợp LTB được tinh sạch bằng gel ProBond™ Purification System Kit . Mức độ biểu hiện protein được phân tích bằng điện di SDS-PAGE 15%.

* Phân tích số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu sinh trưởng được tính giá trị trung bình và phân tích ANOVA (Duncan'test, $p<0,05$) bằng chương trình SAS.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng sinh trưởng của *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp mang gen *eltB* mã hóa protein LTB trong các loại môi trường khác nhau



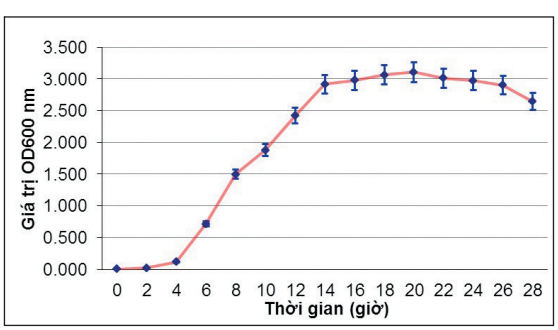
Hình 1. Ảnh hưởng của thành phần môi trường lên sinh trưởng của E. coli chủng BL21 (DE3) tái tổ hợp mang gen eltB mã hóa protein LTB

Chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy chủng *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp mang gen *eltB* mã hóa protein LTB trong các môi trường khác nhau (LB, TB, SOC, SOB và YJ) trong cùng điều kiện (tỷ lệ tiếp giống 1%, sinh trưởng ở 37^{0}C, tốc độ lắc 200 vòng/phút). Sau 9 giờ nuôi

cấy, khả năng sinh trưởng của vi khuẩn *E. coli* được xác định bằng cách đo mật độ quang ở bước sóng 600nm. Kết quả thể hiện trên hình 1 cho thấy 2 môi trường TB và YJ cho giá trị mật độ tế bào cao hơn so với 3 môi trường SOB, SOC và LB. Giá trị OD600nm thu được của hai môi trường này lần lượt là 2,685 và 2,690. Do vậy, có thể sử dụng môi trường TB hoặc YJ để nuôi cấy chủng *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp mang gen *eltB* mã hóa protein LTB.

3.2. Khảo sát đường cong sinh trưởng

Chúng tôi khảo sát đường cong sinh trưởng của vi khuẩn *E. coli* chủng BL21 (DE3) tái tổ hợp mang gen mã hóa kháng nguyên LTB trong 50 ml môi trường TB có bổ sung 50 µg/ml kanamycin ở nhiệt độ 37°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút, tỷ lệ tiếp giống là 0,1% (v/v, OD600 = 1) trong thời gian nuôi 28 giờ. Mật độ tế bào được đo ở OD600nm tại các thời điểm nuôi cấy từ 2 giờ đến 28 giờ, cách 2 giờ đo 1 lần. Đường cong sinh trưởng được xây dựng bằng phần mềm Excel 2007 để tìm thời gian nuôi cấy tối ưu. Kết quả được trình bày ở hình 2.

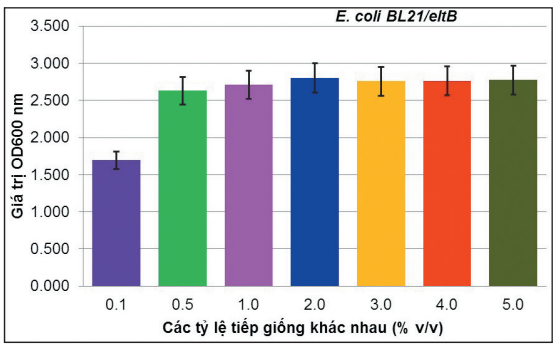


Hình 2. Đường cong sinh trưởng của chủng E. coli BL21 (DE3) mang gen eltB mã hóa protein LTB

Kết quả ở hình 2 cho thấy đường cong sinh trưởng của chủng *E. coli* BL21 mang gen eltB có pha thích nghi (pha lag) kéo dài khoảng 2 giờ, pha sinh trưởng kéo dài từ 2 - 14 giờ, pha cân bằng duy trì từ 14 - 20 giờ và cuối cùng là pha chết. Mật độ tế bào tăng liên tục từ 4 - 14 giờ và đạt giá trị OD600 cao nhất tại thời điểm 14 giờ là 2,917. Thời gian nuôi cấy thích hợp nhất đối với *E. coli* BL21 tái tổ hợp là khoảng 9 giờ nuôi cấy (khoảng ½ pha sinh trưởng).

3.3. Tỷ lệ tiếp giống tối ưu

Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống đến khả năng sinh trưởng của tế bào *E. coli* tái tổ hợp được xác định dựa trên mật độ tế bào (OD600) sau 9 giờ nuôi vi khuẩn trong cùng điều kiện (nhiệt độ, tốc độ lắc, môi trường TB), nhưng khác nhau về tỷ lệ tiếp giống ban đầu. Kết quả ở hình 3 cho thấy tỷ lệ tiếp giống 0,1% cho kết quả thấp nhất với giá trị OD600 thu được là 1,697, tỷ lệ tiếp giống 0,5% cho giá trị OD600 là 2600. Các tỷ lệ tiếp giống còn lại cho kết quả tương đương , trong đó tỷ lệ tiếp giống 2% cho giá trị mật độ tế bào cao nhất với giá trị OD600 là 2,803. Như vậy, tỷ lệ tiếp giống tối ưu khi nuôi cấy *E. coli* chủng BL21 (DE3) mang gen eltB là 2%.



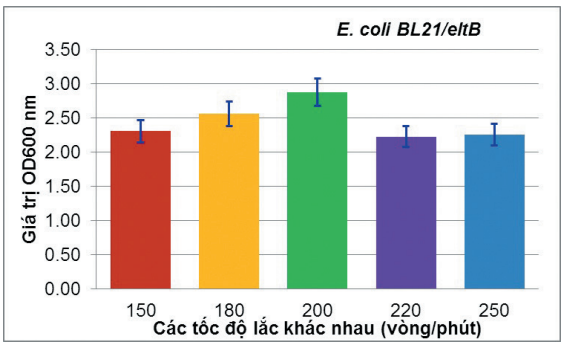
Hình 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống lên sinh trưởng của chủng E. coli BL21 (DE3) tái tổ hợp mang gen eltB mã hóa cho protein LTB

Sử dụng các tỷ lệ tiếp giống khác nhau trong nuôi cấy sinh khối trước khi sản xuất protein tái tổ hợp cũng đã được nhiều tác giả nghiên cứu. Tỷ lệ được sử dụng là 0,1% khi sản xuất các enzyme phosphatase của người [6], 1% trong sản xuất độc tố của *Bacillus anthracis* [5], 2% trong sản xuất hormone gonadotropin [12].

3.4. Tốc độ lắc tối ưu

Chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của tốc độ lắc (150, 180, 200, 220 và 250 vòng/phút) lên khả năng sinh trưởng của vi khuẩn *E. coli* chủng BL21 (DE3) tái tổ hợp mang gen mã hóa protein LTB được nuôi trong môi trường TB có bổ sung

50 µg/ml kanamycin với tỷ lệ tiếp giống là 2%, nhiệt độ nuôi 37°C. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ lắc lên sinh trưởng của tế bào sau 9 giờ nuôi cấy được trình bày ở hình 4.

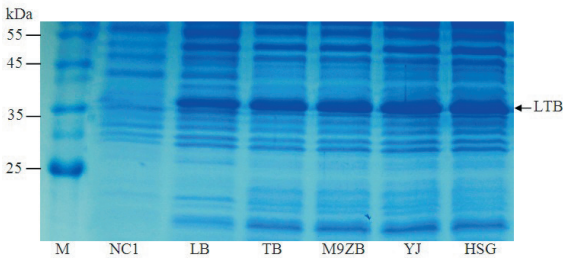


Hình 4. Sinh trưởng của chủng E. coli BL21 (DE3) mang gen eltB mã hóa protein LTB ở các tốc độ lắc khác nhau

Với tốc độ lắc tăng từ 150, 180 đến 200 vòng/phút, sinh khối tế bào đã tăng dần lên và đạt cực đại ở tốc độ lắc 200 vòng/phút với giá trị OD600 thu được là 2,880. Khi tăng tốc độ lắc lên 220 và 250 vòng/phút, tế bào sinh trưởng chậm lại, cho giá trị OD600 là 2,261 và 2,227, tương ứng. Điều này có thể do tốc độ lắc quá nhanh làm môi trường nuôi cấy bị tạo nhiều bọt, làm giảm khả năng tiếp xúc của tế bào đối với các thành phần của môi trường, ảnh hưởng đến sự hô hấp của tế bào. Tốc độ lắc 200 vòng/phút cũng được nhiều tác giả sử dụng trong nhân giống *E. coli* để sản xuất protein tái tổ hợp như sản xuất 3-1E của cầu trùng [1], interleukin-2 của người [7], hay protease của *Bacillus subtilis* [9].

3.5. Môi trường biểu hiện tối ưu

Khả năng biểu hiện của protein dung hợp 6xHis-LTB được khảo sát trên 5 loại môi trường với các thành phần khác nhau (LB, TB, M9ZB, YJ và HSG). Thí nghiệm được tiến hành trong cùng một điều kiện (cảm ứng với 1,2 mM IPTG, lắc 200 vòng/phút, ở 37ºC trong thời gian cảm ứng là 8 giờ). Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm trên gel SDS-PAGE 15% (hình 5) chỉ ra rằng môi trường YJ và HSG đều cho kết quả biểu hiện protein dung hợp tái tổ hợp 6xHis-LTB tốt. Ba môi trường còn lại LB, TB và M9ZB cho nồng độ protein tái tổ hợp thấp hơn, trong đó môi trường LB cho nồng độ thấp nhất. Vì vậy, môi trường LB không thích hợp cho biểu hiện protein dung hợp tái tổ hợp 6xHis-LTB. Nguyễn Hoàng Lộc và cs (2014) cho thấy môi trường thích hợp cho biểu hiện kháng nguyên bám dính K88-1NT là môi trường M9ZB cải tiến [2]. Kết quả nghiên cứu trước của chúng tôi cũng cho thấy YJ là môi trường thích hợp để biểu hiện kháng nguyên 3-1E của cầu trùng gà [1].



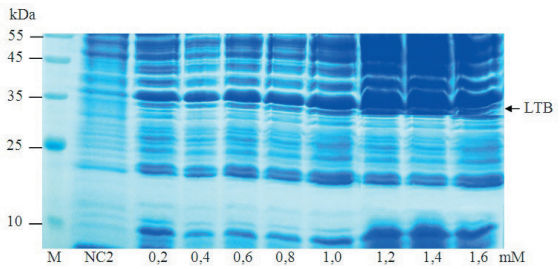
Hình 5. Ảnh hưởng của môi trường lên mức độ biểu hiện protein tái tổ hợp LTB

M: khối lượng thang chuẩn protein (10-170 kDa, Bio-Base). NC1: E. coli không mang vector tái tổ hợp. NC2: E. coli mang vector tái tổ hợp không bổ sung chất cảm ứng IPTG LB, TB, M9ZB, YJ và HSG: E. coli mang vector tái tổ hợp được cảm ứng IPTG trong các môi trường LB, TB, M9ZB, YJ và HSG.

3.6. Nồng độ tối ưu của chất cảm ứng IPTG

Nồng độ của chất cảm ứng có ảnh hưởng lớn đến hiệu suất biểu hiện của protein tái tổ hợp. Để xác định nồng độ tối ưu của IPTG (BioRad) sử dụng cho cảm ứng biểu hiện kháng nguyên LTB trên môi trường YJ với nhiệt độ cảm ứng 37ºC, lắc 200 vòng/phút trong thời gian 8 giờ, chúng tôi sử dụng IPTG với các nồng độ 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2 và 1,6 mM. Kết quả điện di trên gel SDS-PAGE 15% (hình 6) cho thấy kháng nguyên tái tổ hợp LTB bắt đầu tổng hợp khi bổ sung với 0,2 mM IPTG, tăng dần qua các nồng độ khác nhau, đạt giá trị cao nhất khi nồng độ IPTG là 1,2 mM và 1,4 mM. Tuy nhiên, ở nồng độ chất cảm ứng 1,6 mM IPTG thì lượng protein dung hợp 6xHis-LTB thu được lại giảm. Sở dĩ có hiện tượng này xảy ra là do ở nồng độ cao,

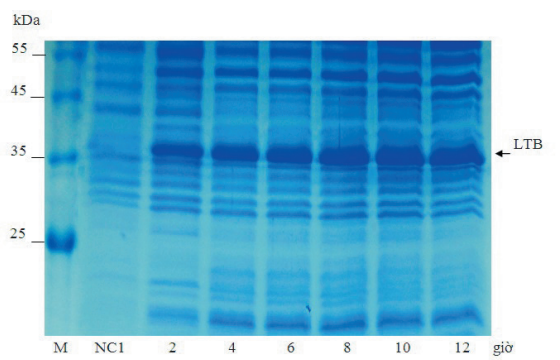
IPTG có thể gây độc cho tế bào làm cho tế bào chết, dẫn đến lượng protein dung hợp thu được cũng giảm đi. Kết quả trong nghiên cứu trước của chúng tôi cho thấy trong sản xuất protein tái tổ hợp 3-1E trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3), nồng độ chất cảm ứng IPTG là tối ưu 1mM [1].



Hình 6. Kết quả biểu hiện protein LTB tái tổ hợp khi được cảm ứng bởi IPTG ở các nồng độ khác nhau

M: khối lượng thang chuẩn protein (10-170 kDa, Bio-Base). NC2: Tế bào E. coli tái tổ hợp không bổ sung chất cảm ứng IPTG. 0,2- 1,6 mM: E. coli mang vector tái tổ hợp được cảm ứng bởi IPTG ở các nồng độ 0,2- 1,6 mM.

3.7. Thời gian cảm ứng tối ưu

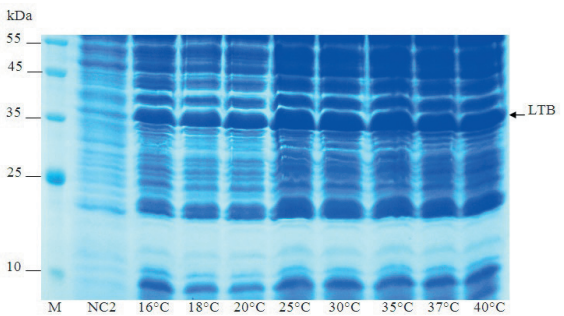


Hình 7. Ảnh hưởng của thời gian cảm ứng lên biểu hiện kháng nguyên tái tổ hợp LTB

M: khối lượng thang chuẩn protein (10-170 kDa, Bio-Base). NC1: tế bào E. coli không mang vector tái tổ hợp. 2- 12 giờ: là thời gian cảm ứng 1 mM IPTG.

Chúng tôi đã tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian cảm ứng IPTG khác nhau (2, 4, 6, 8, 10, 12 giờ) lên mức độ biểu hiện protein LTB trong cùng điều kiện (1,0 mM IPTG, lắc 200 vòng/phút, nhiệt độ cảm ứng 37ºC) . Kết quả tách chiết protein và điện di trên gel SDS-PAGE 15% cho thấy protein dung hợp 6xHis-LTB có khả năng biểu hiện tốt và tăng dần theo thời gian cảm ứng từ 2 đến 8 giờ, đạt giá trị cao nhất ở thời điểm 8 giờ, sau đó lượng protein hầu như không tăng thêm, cho giá trị tương đương ở các thời điểm 8, 10 và 12 giờ cảm ứng. Như vậy thời gian cảm ứng IPTG thích hợp để biểu hiện protein LTB là 8 giờ (hình 7).

3.8. Nhiệt độ cảm ứng tối ưu



Hình 8. Ảnh hưởng của nhiệt độ cảm ứng lên quá trình sản xuất protein LTB tái tổ hợp

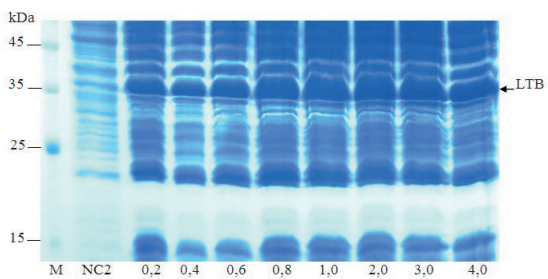
M: khối lượng thang chuẩn protein (10 - 170 kDa, Bio-Base). NC2: E.coli không mang gen eltB. 16°C- 40°C: các mức nhiệt độ cảm ứng.

Để xác định nhiệt độ cảm ứng tối ưu cho quá trình biểu hiện protein, sau khi đã nuôi tăng sinh vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp mang gen *eltB* ở 37°C trong môi trường YJ có bổ sung kanamycin đến khi đạt mật độ tế bào có OD600 là 0,8, chúng tôi bổ sung IPTG với nồng độ 1,2 mM và tiếp tục nuôi cảm ứng ở các mức nhiệt độ khác nhau, dao động từ 16°C đến 40°C, với nồng độ IPTG là 1,2 mM trong thời gian 8 giờ, tốc độ lắc 200 vòng/phút . Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm trên gel SDS-PAGE 15% (hình 8) cho thấy, khi được cảm ứng ở nhiệt độ 25°C, 30°C và 35°C, lượng protein thu được tương đương nhau và ở mức cao hơn khi được cảm ứng ở các mức nhiệt

độ khác. Như vậy, nhiệt độ cảm ứng thích hợp cho quá trình biểu hiện của gen *eltB* dao động từ 25°C cho đến 35°C. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự với kết quả nghiên cứu của Lee và cs (2006), nhiệt độ tối ưu để cảm ứng biểu hiện L-threonine trong *E. coli* MT201 ở quy mô phòng thí nghiệm là 30°C [10].

3.9. Mật độ tế bào tối ưu tại thời điểm bổ sung chất cảm ứng

Để khảo sát ảnh hưởng của mật độ tế bào tại thời điểm bổ sung chất cảm ứng lên quá trình sản xuất protein tái tổ hợp LTB, chúng tôi đã nuôi vi khuẩn mang gen *eltB* trong cùng một điều kiện và bổ sung chất cảm ứng tại các thời điểm dịch nuôi cấy đạt các mật độ tế bào khác nhau (có OD600 dao động từ 0,2 - 4,0). Kết quả cho thấy khả năng sinh tổng hợp protein LTB đạt giá trị cao nhất nếu bổ sung chất cảm ứng vào thời điểm mật độ tế bào vi khuẩn đạt OD600 từ 0,8 đến 2,0 (hình 9). Kigawa và cs (2004) cho rằng mật độ tế bào thích hợp nhất để cảm ứng biểu hiện endoglucanase chịu nhiệt từ *Clostridium thermocellum* là mật độ có OD600 từ 0,8 - 1 [8].

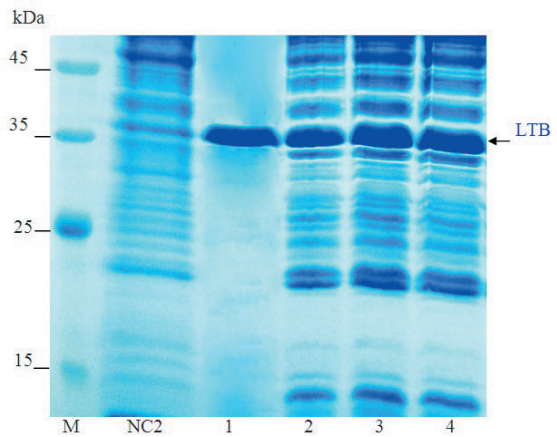


Hình 9. Ảnh hưởng của mật độ tế bào tại thời điểm bổ sung chất cảm ứng IPTG lên khả năng biểu hiện protein LTB

M: khối lượng thang chuẩn protein (10-170 kDa). NC2: Tế bào E. coli tái tổ hợp không bổ sung chất cảm ứng IPTG sinh trưởng ở 37°C. 0,2- 4,0: OD600 của mật độ tế bào E. coli mang vector tái tổ hợp tại thời điểm bổ sung chất cảm ứng.

3.10. Tinh sạch protein LTB tái tổ hợp

Sau khi đã xác định được điều kiện nuôi cấy và điều kiện biểu hiện tối ưu, chúng tôi tiến hành nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* BL21 tái tổ hợp mang gen *eltB* trong 400 ml môi trường YJ có bổ sung kanamycin (50 µg/ml), nhiệt độ nuôi cấy 37ºC, tốc độ lắc 200 vòng/phút, khi mật độ tế bào vi khuẩn đạt OD600 = 1,0 thì tiến hành cảm ứng với 1,2 mM IPTG, nuôi lắc 200 vòng/phút ở 25ºC trong thời gian 8 giờ. Dịch thu được sau khi phá vỡ tế bào có chứa protein tái tổ hợp LTB được lọc bằng gel ProBond™ Purification System Kit (Invitrogen, USA). Độ tinh sạch của protein được thể hiện trong kết quả điện di (hình 10). Kết quả cho thấy sản phẩm protein thu được cho một băng protein với kích thước khoảng 35kDa.



Hình 10. Kháng nguyên LTB thu được sau tinh sạch bằng gel ProBondTM Nickel-Chelating Resin

M: khối lượng thang chuẩn protein (10-170 kDa, Bio-Base). NC2: tế bào E. coli tái tổ hợp không bổ sung chất cảm ứng IPTG, sinh trưởng ở 37°C. 1: protein tái tổ hợp LTB sau khi lọc qua cột sắc ký 2, 3 và 4: protein tái tổ hợp chưa lọc qua cột sắc ký

IV. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tối ưu hóa được quy trình sản xuất protein tái tổ hợp LTB ở quy mô phòng thí nghiệm. Môi trường nuôi cấy TB và YJ cho khả năng sinh trưởng tốt nhất với tỷ lệ tiếp giống 2% (OD600 = 0,8), lắc 200 vòng/phút ở 37ºC sau

9 giờ nuôi cấy. Mức độ biểu hiện của protein dung hợp 6xHis-LTB cho kết quả tốt nhất trên môi trường YJ hoặc HSG, nồng độ chất cảm ứng IPTG là 1,2 mM, nuôi lắc ở 200 vòng/phút, nhiệt độ cảm ứng 25ºC-35ºC trong thời gian 8 giờ. Sắc ký lọc gel cho thấy sản phẩm protein dung hợp 6xHis-LTB có khối lượng phân tử khoảng 35 kDa.

Lời cảm ơn: *Xin trân trọng cảm ơn Bộ Giáo dục và Đào tạo đã cấp kinh phí cho nghiên cứu này thông qua đề tài cấp Bộ với mã số B2016-DHH-25.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đinh Thị Bích Lân, Phùng Thăng Long, Huỳnh Văn Chương, Đặng Thanh Long, Hoàng Tấn Quảng, Lê Đức Thạo, Lê Quốc Việt, Lê Công Thịnh, Đặng Thị Hương, Hoàng Thị Thùy Nhung (2016). Cải thiện mức độ biểu hiện kháng nguyên tái tổ hợp 3-1E của *Eimeria* trong *Escherichia coli* BL21, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, Tập XXII, (7), tr. 60-67.
2. Nguyễn Hoàng Lộc, Nguyễn Thị Khánh Quỳnh, Hoàng Tấn Quảng, Trần Thúy Lan, Lê Mỹ Tiểu Ngọc, Đinh Thị Bích Lân, Phùng Thăng Long. 2014. Nghiên cứu cải thiện mức độ biểu hiện của kháng nguyên bám dính K88 tái tổ hợp phân lập từ *Escherichia coli* mang độc tố đường ruột của lợn con cai sữa. *Tạp chí sinh học*, 36(1se): 120-125.
3. Cai Y., Yordan M.A., Yao Q., Li Y., Yu L. (2016). Review of enterotoxigenic *Escherichia coli* enterotoxins. *Acad. J. Microbiol. Res*. 4(1): 005-008.
4. Gill D.M., Richardson S.H., 1980. Adenosine diphosphate-ribosylation of adenylate cyclase catalyzed by heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*: comparison with cholera toxin. *The Journal of infectious diseases*, 141: 64–70.
5. Gupta P., Sahai V., Bhatnagar R., 2001. Enhanced expression of the recombinant lethal factor of Bacillus anthracis by fed-batch culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285: 1025-1033.
6. Hedren M., Ballagi A., Mörtsell L., Rajkai G., Stenmark P., Sturesson C., Nordlund P., 2006. GRETA, a new multifermenter system for structural genomics and process optimization, *Acta Crystallographica*, 62(D): 1227-1231.
7. Javier E.F., Michael W.R., 1998. Role of Immunoglobulin A Monoclonal Antibodies against P23 in Controlling Murine *Cryptosporidium parvum* infection. *Infection and Immunity*, 66(9): 4496-4473.
8. Kigawa T., Yabuki T., Matsuda N., Matsuda T., Nakajima R., Tanaka A., Yokoyama S., 2004. "Preparation of *Escherichia coli* cell extract for highly productive cell-free protein expression", *Journal of Structural and Functional Genomics*, 5: 63-68.
9. Lee D.H., Kim M.D., Lee W.H., Kweon D.H. Seo J.H., 2004. Consortium of fold-catalyzing proteins increases soluble expression of cyclohexanone monooxyase in recombinant *Escherichia coli*. *Apply of Microbiology and Biotechnology*, 63: 549-552.
10. Lee M.Y., Lee H.W., Park J.H., Ahn J.O., Jung J.K., Hwang Y.I., 2006. Improved L-Threonine production of *Escherichia coli* mutant by optimization of culture conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2): 127-130.
11. Svennerholm A.-M., Tobias J., 2008. Vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Expert review of vaccines*, 7:. 795–804.
12. Xu J., Li W., Wu J., Zhang Y., Zhu Z., Liu J., Hu Z., 2006. Stability of plasmid and expression of a recombinant gonadotropin-releasing hormone (GnRH) vaccine in *Escherichia coli*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73: 780-788.

Ngày nhận 28-11-2017
Ngày phản biện 6-2-2018
Ngày đăng 1-5-2018