

NGHIÊN CỨU LỰA CHỌN ĐIỀU KIỆN BIỂU HIỆN KHÁNG THỂ ĐƠN CHUỖI TÁI TỔ HỢP NHẬN BIẾT KHÁNG NGUYÊN NHÓM MÁU A TRONG CHỦNG *Escherichia coli*

Đặng Thị Ngọc Hà, Nguyễn Thị Trung, Lê Thị Thu Hồng, Đỗ Thị Huyền, Trương Nam Hải*

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

TÓM TẮT: Kháng thể đơn chuỗi tái tổ hợp nhận biết đặc hiệu kháng nguyên nhóm máu A trong hệ ABO (antiA_scFv) đã được thiết kế biểu hiện trong *Escherichia coli*. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát các điều kiện lên men nhằm tăng hiệu suất biểu hiện antiA_scFv đồng thời tiết kiệm chi phí và thời gian nuôi cấy. Kết quả cho thấy, antiA_scFv được biểu hiện tốt nhất trong môi trường TB, ở nhiệt độ biểu hiện 30°C, nồng độ chất cảm ứng 0,1 mM IPTG và thời điểm cảm ứng khi tế bào ở giai đoạn sinh trưởng theo cấp số nhân có mật độ tế bào OD₆₀₀ = 1,5. Với điều kiện lên men được lựa chọn, sinh khối tế bào thu được tăng gấp 5,2 lần (từ OD₆₀₀ = 3,27 đến OD₆₀₀ = 17,02) và năng suất thu hồi protein antiA_scFv tăng đáng kể so với điều kiện ban đầu trước khi tối ưu.

Từ khóa: *Escherichia coli*, kháng thể đơn chuỗi tái tổ hợp, kháng nguyên nhóm máu A.

MỞ ĐẦU

Xác định nhóm máu hệ ABO hay Rh là công việc bắt buộc đối với người cho và nhận máu. Hiện nay, để xác định nhóm máu thường sử dụng huyết thanh mẫu. Đó là sản phẩm của việc nuôi cấy tế bào lai hay tách chiết máu của người tình nguyện theo cách truyền thống. Cách làm này rất tốn kém và không chủ động được nguồn nguyên liệu. Nhờ sự phát triển của công nghệ protein tái tổ hợp, việc tạo kháng thể đơn chuỗi đang ngày càng được phát triển. Kháng thể đơn chuỗi có kích thước nhỏ hơn phân tử kháng thể tự nhiên, ít gây kích ứng miễn dịch nên được ưu tiên sử dụng trong y tế và nghiên cứu. Kháng thể đơn chuỗi được ứng dụng rất nhiều trong chẩn đoán (Ahmad et al., 2012). Bên cạnh đó, kháng thể đơn chuỗi có thể được sử dụng cho mục đích điều chỉnh và phát hiện sự hoạt động của các protein trong tế bào, như vậy phù hợp cho việc sử dụng làm vaccine (Alvarez-Rueda et al., 2009). Ngoài ra, kháng thể đơn chuỗi còn được ứng dụng trong điều trị ung thư (Chester et al., 2004) và chống lại virus bệnh dại glycoprotein (Yuan et al., 2013).

Chúng tôi đã tạo được chủng *E. coli* mang gen biểu hiện kháng thể đơn chuỗi tái tổ hợp nhận biết đặc hiệu kháng nguyên nhóm máu A (antiA_scFv) của hệ ABO. Kháng thể đơn chuỗi antiA_scFv sẽ được sử dụng cho mục đích xác định nhóm máu. Tế bào vi khuẩn *E. coli* là một

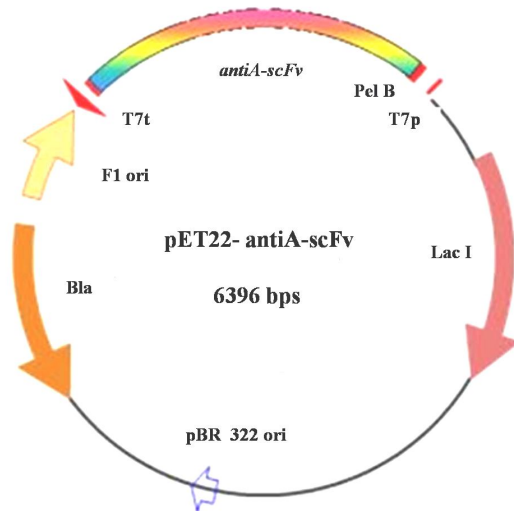
hệ biểu hiện đã được nghiên cứu kỹ về di truyền và có khả năng tổng hợp lượng lớn protein ngoại lai với điều kiện nuôi cấy đơn giản và rẻ tiền. Tuy nhiên, đối với mỗi protein tái tổ hợp, điều kiện phù hợp để tổng hợp trong mỗi tế bào khác nhau (Chan et al., 2010). Do đó, việc lựa chọn được các điều kiện nuôi cấy phù hợp nhằm mục đích làm tăng sản lượng protein antiA_scFv trong mỗi tế bào và tăng mật độ tế bào trong mỗi đơn vị thể tích nuôi cấy là cần thiết. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành cải tiến các điều kiện biểu hiện gen antiA_scFv trong *E. coli* như môi trường nuôi cấy, nhiệt độ nuôi cấy, nồng độ chất cảm ứng và OD cảm ứng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng và vector biểu hiện

Trình tự gen mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng chuỗi nhẹ của kháng thể kháng nhóm máu A được phân lập từ dòng tế bào lai A6G11C9 sản xuất kháng thể đơn dòng nhận biết nhóm máu A hệ ABO do phòng kỹ thuật di truyền nghiên cứu. Chủng biểu hiện được sử dụng là *E. coli* BL21(DE3). Vector biểu hiện pET22b(+) (Novagen, Hoa Kỳ) mang gen antiA_scFv dùng cho biểu hiện gen mã hóa kháng thể đơn chuỗi tái tổ hợp nhận biết đặc hiệu kháng nguyên nhóm máu A (tổng hợp từ Genscript). Trình tự gen mã hóa cho antiA_scFv đã được thiết kế

như sau: gen mã hóa cho vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H), chuỗi nhẹ (V_L) của kháng thể kháng nhóm máu A được nối với trình tự gen mã hóa c-myc cho mục đích nhận biết protein tái tổ hợp.



Hình 1. Sơ đồ vector tái tổ hợp pET22-antiA-scFv

Các hóa chất sử dụng cho điện di và western blotting như: thang protein chuẩn mua từ hãng Fermentas (CHLB Đức), hóa chất nhuộm Coomassie xuất xứ từ hãng Merck (CHLB Đức), skim milk của hãng Difco (Hoa Kỳ), TMB của hãng Sigma (Hoa Kỳ). Kháng thể C-myc xuất xứ từ hãng Sigma (Hoa Kỳ) sử dụng cho phản ứng lai western blotting. Các hóa chất sử dụng pha môi trường nuôi cấy có xuất xứ từ hãng Merck (CHLB Đức).

Biểu hiện gen mã hóa kháng thể đơn chuỗi tái tổ hợp antiA_scFv

Chúng *E. coli* BL21 mang vector biểu hiện pET22b(+) *anti A_scFv* được nuôi cấy trong môi trường LB chứa 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampiciline (Amp), nuôi lắc 200 vòng/phút ở 37°C qua đêm. Sau đó, dịch tế bào nuôi qua đêm được chuyển sang môi trường LBA mới đến OD = 0,1, nuôi tiếp ở 37°C, lắc 200 vòng/ phút đến khi OD đạt 0,6 – 0,8 được cảm ứng bởi 0,5 mM isopropyl β - D- thiogalactopyranoside (IPTG) (Studier et al., 1990), chuyển sang 30°C nuôi lắc 200 vòng/ phút trong 4 giờ. Sau lên men, tế bào được thu lại bằng ly tâm 8000 vòng/ phút trong 10 phút

và được hòa lại về cùng một mật độ tế bào OD₆₀₀ = 10 trong đệm Tris-HCl 20 mM ,pH = 8. Xử lý mẫu và điện di kiểm tra protein trên gel SDS-PAGE 12,6% (Laemmli, 1970)

Phương pháp lai western blotting

Tính kháng nguyên của kháng thể antiA_scFv tái tổ hợp được nhận biết qua phản ứng lai western blotting với kháng thể kháng C-myc. Protein sau khi điện di trên gel SDS-PAGE sẽ được chuyển sang màng PVDF. Sau đó, màng được ủ lần lượt với Skimmilk 5% trong TBS 1x, kháng thể 1 kháng C-myc, kháng thể 2 antimouse IgG-peroxidase trong 1 giờ. Cuối cùng phản ứng lai được hiện màu bằng dung dịch TMB.

Các điều kiện biểu hiện gen *anti A_scFv*

Các môi trường chuẩn bị cho biểu hiện gen gồm: Môi trường TB (1,2% peptone; 2,4% yeast extract; 0,4% glycerol, 72 mM K₂HPO₄, 17 mM KH₂PO₄), LB (1% peptone; 0,5% yeast extract; 0,5% NaCl), SB (3,2% peptone; 2% yeast extract; 0,5% NaCl), M9 (0,3% KH₂PO₄; 0,6% Na₂HPO₄; 0,5% NaCl; 0,1% NH₄Cl; 2mM MgSO₄; 0,1 mM CaCl₂; 0,4% glycerol), M9 + 0,5% yeast extract, M9 + 1% glucose, M9 + 1% glycerol, M9 + 0,5% yeast extract + 1% glucose và M9 + 0,5% yeast extract + 1% glycerol.

Tế bào *E. coli* BL21 chứa plasmid pET22b(+) mang gen mã hóa antiA_scFv được nuôi cấy trong môi trường LB chứa 100 $\mu\text{g/ml}$ Amp ở 37°C, lắc 200 vòng/ phút, qua đêm. Sau đó, dịch tế bào nuôi qua đêm được chuyển sang các môi trường như đã nêu ở trên tới mật độ tế bào OD = 0,1 và nuôi ở 37°C đến khi đo OD đạt 0,6-0,8 thì cảm ứng IPTG với nồng độ cuối cùng là 0,5 mM và tiếp tục nuôi ở 30°C. Sau 4 giờ cảm ứng, ly tâm thu tế bào và điện di protein trên gel SDS - PAGE 12,6% để kiểm tra sự biểu hiện của antiA_scFv và lựa chọn môi trường biểu hiện tốt nhất.

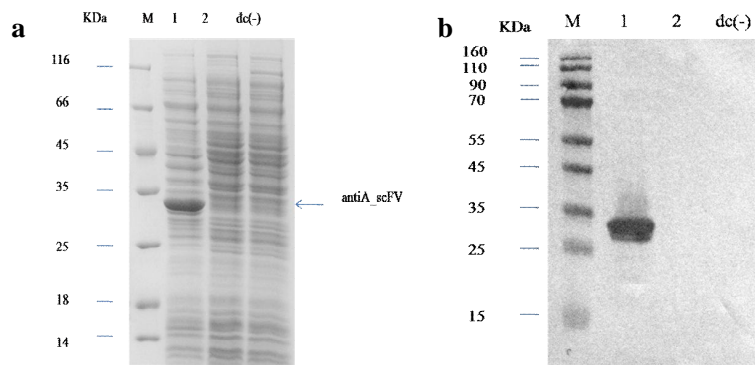
Sau khi lựa chọn được môi trường biểu hiện, chúng tôi tiếp tục khảo sát các điều kiện nồng độ IPTG cảm ứng, nhiệt độ biểu hiện và OD cảm ứng để lựa chọn điều kiện thu được protein cũng như mật độ tế bào trên mỗi đơn vị thể tích nuôi cấy cao nhất, đồng thời tiết kiệm nhất về chi phí và thời gian.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Biểu hiện của anti A_scFv tái tổ hợp

Đầu tiên, chúng tôi khảo sát sơ bộ sự biểu hiện của gen *antiA_scFv* trong chủng *E. coli* tái tổ hợp ở điều kiện thông thường là môi trường LB, nồng độ chất cảm ứng 0,5 mM IPTG và nhiệt độ cảm ứng biểu hiện là 30°C. Sau 4 giờ lên men cảm ứng, mật độ tế bào thu được OD₆₀₀ là 3,27. Kết quả phân tích protein cho thấy, so với chủng đối chứng không mang gen và chủng mang gen nhưng không cảm ứng IPTG, chủng

mang gen có cảm ứng IPTG xuất hiện thêm một băng protein đậm có kích thước khoảng 33 kDa (hình 2a). Theo tính toán lý thuyết, protein anti A_scFv có kích thước khoảng 33 kDa. Để khẳng định băng protein này là protein ngoại lai anti A_scFv như được thiết kế, chúng tôi tiến hành kiểm tra với kháng thể kháng c-myc. Kết quả lai Western blot cho thấy protein này bắt cặp đặc hiệu với kháng thể (hình 2b). Như vậy, antiA_scFv đã được biểu hiện và chúng tôi tiến hành tối ưu các điều kiện biểu hiện nhằm nâng cao năng suất sản xuất protein tái tổ hợp.



Hình 2. Phân tích kết quả biểu hiện protein tái tổ hợp antiA_scFv trong *E. coli* ở điều kiện khảo sát ban đầu. a. SDS-PAGE, b. Western blot.

Các chủng tái tổ hợp được nuôi cấy lên men trong môi trường LB ở 30°C. Sau 4 giờ cảm ứng, mẫu tế bào được thu lại và protein tổng số được kiểm tra bằng điện di và Western blot; ĐC(-): Mẫu đối chứng mang vector pET22b(+); 1: Mẫu đối chứng mang gen *anti A_scFv* không được cảm ứng IPTG; 2: Mẫu mang gen *anti A_scFv* được cảm ứng 0,5 mM IPTG; M: Thang protein chuẩn Fermentas.

Tối ưu môi trường biểu hiện antiA_scFv

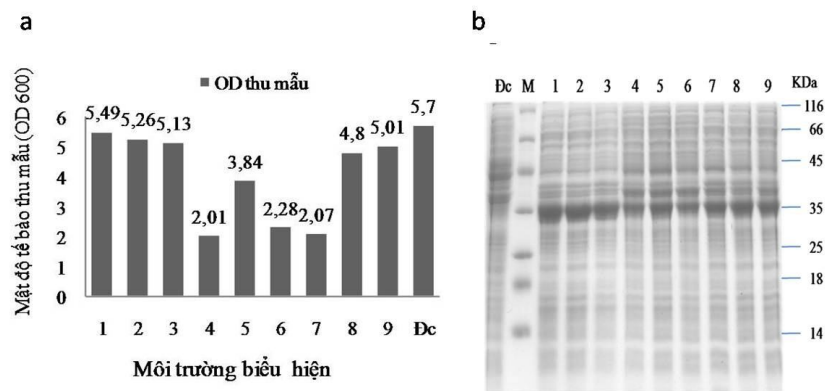
Sự tổng hợp các protein không cần thiết trong tế bào *E. coli* có thể dẫn đến giảm tốc độ tăng trưởng của tế bào (Malakar & Venkatesh, 2012). Đồng thời, sự tăng trưởng và tích lũy các sản phẩm trao đổi chất trong tế bào cũng chịu tác động mạnh mẽ của các thành phần có trong môi trường nuôi cấy như nguồn cacbon, nitơ, yếu tố tăng sinh và các muối vô cơ (Li et al., 2002). Vì vậy, để tìm được môi trường phù hợp cho biểu hiện gen *antiA_scFv*, chúng tôi đã khảo sát 9 loại môi trường khác nhau như trình bày ở phần phương pháp. Sự sinh trưởng và mật độ tế bào thu được sau lên men của chủng *E. coli* tái tổ hợp biểu hiện gen *antiA_scFv* có sự khác nhau giữa các môi trường (hình 3a). Môi trường M9 và M9 + 1% glycerol có mật độ tế

bào thấp nhất, OD₆₀₀ thu mẫu chỉ đạt tương ứng là 2,01 và 2,07. Các môi trường M9 + 0,5 % yeast extract và M9 + 1% glucose có mật độ tế bào thấp và lượng sinh khối thu được không cao. Môi trường LB, SB, M9 + 0,5 % yeast extract + 1% glycerol và M9 + 0,5% yeast extract + 1% glucose có mật độ tế bào thu mẫu tương đối cao và lượng sinh khối thu được khá lớn. Tuy nhiên, đáng chú ý nhất là môi trường TB cho mật độ tế bào cao nhất với giá trị OD₆₀₀ = 5,49 gấp 2,7 lần môi trường M9. Sự khác biệt trên có thể do thành phần môi trường M9 nghèo chất dinh dưỡng chỉ chứa lượng muối khoáng cần thiết cho vi khuẩn phát triển, môi trường M9 bổ sung các thành phần glycerol, glucose, yeast extract chỉ cung cấp được nguồn các cacbon hoặc nitơ và muối khoáng mà chưa cung

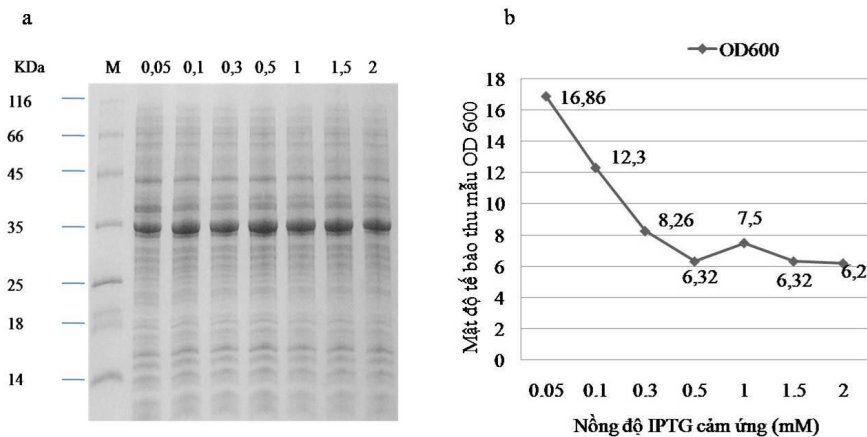
cấp đủ dinh dưỡng thiết yếu cho sự phát triển của tế bào. Vì vậy, mật độ tế bào thu được tương đối kém. Trong khi đó, môi trường TB là môi trường giàu dinh dưỡng với các thành phần cao nấm men và pepton cung cấp nguồn nitơ, cacbon và muối khoáng dồi dào cho sự phát triển của tế bào.

Kết quả phân tích protein cho thấy, sự tổng hợp protein ngoại lai antiA_scFv trong cùng một đơn vị mật độ tế bào ở các môi trường cũng có sự khác nhau (hình 3b). Trong môi trường M9 và M9 + 1% glycerol, protein antiA_scFv

được tổng hợp kém nhất (hình 3b). Các môi trường M9 + 1% glucose, M9 + 0,5% yeast extract + 1% glycerol và M9 + 0,5% yeast extract + 1% glucose protein đích tổng hợp nhiều hơn. Lượng protein đích tích lũy trong môi trường TB, SB và LB nhiều nhất và tương đối giống nhau. Tuy nhiên, đối chiếu với kết quả thu sinh khối tế bào cho thấy, trong môi trường TB, hiệu quả thu protein đích cao hơn LB và SB. Vì vậy, TB là môi trường được lựa chọn cho biểu hiện gen *antiA_scFv*.



Hình 3. Biểu hiện antiA_scFv trong các môi trường khác nhau. a: Sinh khối tế bào tại thời điểm thu mẫu (OD₆₀₀). b: SDS-PAGE. (ĐC): Mẫu không cảm ứng nuôi trong môi trường LBA. (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9): Protein tổng số trong các môi trường TB; SB; LB; M9; M9+ 0,5% YE; M9 + 1% glucose; M9 + 1% glycerol; M9 + 0,5% YE + 1% glucose; M9 + 0,5% YE + 1% glycerol.



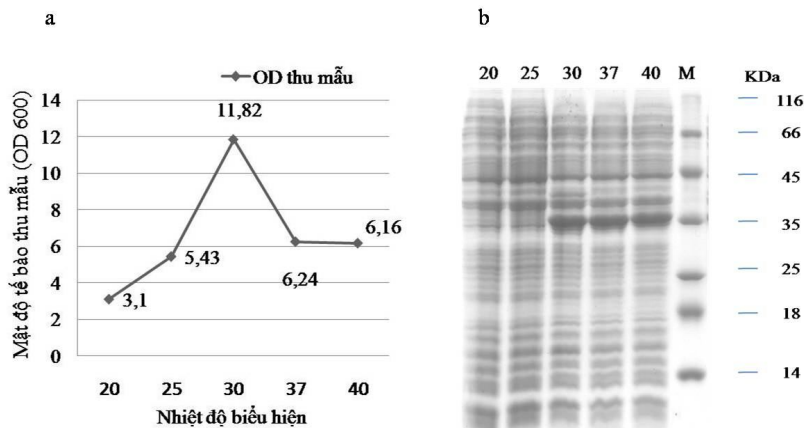
Hình 4. AntiA_scFv tại các nồng độ IPTG khác nhau. a: SDS-PAGE b: OD thu mẫu theo nồng độ IPTG. Kết quả điện di mẫu biểu hiện ở các nồng độ cảm ứng tương ứng 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 1; 1,5; 2 mM. M: thang chuẩn protein).

Tối ưu nồng độ chất cảm ứng IPTG

Chất cảm ứng cũng là một trong những yếu tố quan trọng quyết định sự biểu hiện của protein ngoại lai, do đó xác định được nồng độ chất cảm ứng thích hợp là điều kiện cần thiết trong quá trình biểu hiện. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát khả năng biểu hiện của gen *antiA_scFv* ở các nồng độ IPTG khác nhau: 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 1; 1,5 và 2 mM. Sinh khối tế bào thu được giảm khi nồng độ chất cảm ứng tăng trong khoảng 0,05 đến 0,5 mM và những nồng độ tiếp theo sự khác biệt không đáng kể (hình 4b). Kết quả phân tích protein cho thấy *antiA_scFv* được biểu hiện ở tất cả các nồng độ IPTG cảm ứng (hình 4a). Sự tích lũy của protein đích này được quan sát thấy nhiều nhất khi nồng độ IPTG là 0,1 mM. Nồng độ này thấp hơn so với nồng độ thông thường sử dụng, điều này đã được chứng minh bằng việc đã tăng cường khả năng biểu hiện của protein tái tổ hợp rPsA khi giảm nồng độ IPTG gấp 10 lần so với nồng độ thông thường (Larentis et al., 2011). Mặc dù ở nồng độ này mật độ tế bào thu mẫu ($OD_{600} = 12,3$) thấp hơn tại nồng độ 0,05 mM IPTG ($OD_{600} = 16,86$), nhưng đánh giá chung lại thì hiệu quả thu protein *antiA_scFv* là tốt hơn. Bên cạnh đó, IPTG là chất cảm ứng có giá thành cao trong biểu hiện protein tái tổ hợp, nên khi sử dụng IPTG với nồng độ thấp sẽ tiết kiệm được chi phí. Do đó, chúng tôi lựa chọn nồng độ IPTG tối ưu là 0,1 mM để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

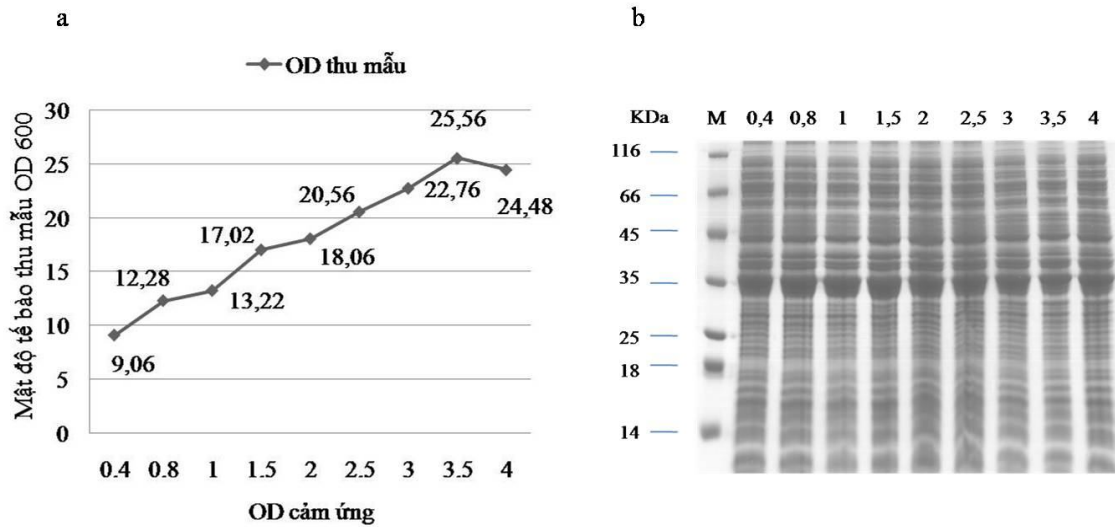
Tối ưu nhiệt độ biểu hiện

Nhiệt độ cảm ứng biểu hiện là một yếu tố ảnh hưởng đến sự tổng hợp protein ngoại lai trong vi khuẩn. Nhiệt độ quá thấp hay quá cao đều ảnh hưởng đến sự tăng trưởng và biểu hiện protein (Farewell & Neidhardt, 1998). Để đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ đến mức độ tổng hợp của *antiA_scFv*, chủng tái tổ hợp đã được lên men cảm ứng ở các nhiệt độ 20°C, 25°C, 30°C, 37°C và 40°C. Kết quả so sánh mật độ tế bào thu mẫu cho thấy sự tăng trưởng của tế bào tăng khi nhiệt độ tăng từ 20°C-30°C nhưng khi tiếp tục tăng nhiệt độ lên 37°C và 40°C, sự tăng trưởng bắt đầu giảm (hình 5a). Như vậy, sự tăng trưởng của tế bào tốt nhất ở 30°C và mật độ tế bào thu được $OD_{600} = 11,82$ gấp khoảng 2 lần so với các nhiệt độ cùng khảo sát. Kết quả phân tích protein cho thấy, ở nhiệt độ 20°C và 25°C *antiA_scFv* không được tổng hợp, ở 30°C, 37°C và 40°C protein được biểu hiện. Sự tích lũy của protein tái tổ hợp trên một đơn vị tế bào không có sự khác biệt giữa 3 nhiệt độ này (hình 5b). Đối chiếu với kết quả mật độ tế bào thu mẫu chỉ ra hiệu quả tốt nhất thu protein *antiA_scFv* ở 30°C. Theo nghiên cứu của Santala & Lamminmäki (2004) việc tối ưu nhiệt độ biểu hiện hoocmon chống kích thích tuyến giáp scFv trong chủng Origami B được lựa chọn là 24°C, nhiệt độ biểu hiện tối ưu cho anti HER2-scFv trong *E. coli* BL21(DE3) là 37°C (Akbari et al., 2015). Như vậy, tùy vào chủng và vector biểu hiện, có sự lựa chọn nhiệt độ tối ưu khác nhau cho biểu hiện protein mục tiêu.



Hình 5. a. OD thu mẫu tại các nhiệt độ nuôi cấy sau cảm ứng; b. SDS-PAGE.

Mẫu protein biểu hiện tổng số tại các nhiệt độ khác nhau (20, 25, 30, 37, 40°C). M: Thang protein chuẩn fermentas.



Hình 6. a. Mật độ tế bào tại thời điểm thu mẫu (OD_{600}) b. SDS-PAGE.

AntiA_scFv tại các OD cảm ứng khác nhau. 0,4; 0,8; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 và 4 lần lượt là các mẫu tổng số biểu hiện antiA_scFv tại các thời điểm cảm ứng. M: Thang protein chuẩn fermentas

Tối ưu OD cảm ứng

Thời điểm cảm ứng cũng là yếu tố quan trọng cần nghiên cứu để tối ưu năng suất thu hồi protein đích. Để xác định thời điểm cảm ứng phù hợp, chúng tôi tiến hành cảm ứng ở các thời điểm có $OD_{600} = 0,4; 0,8; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5$ và 4. Kết quả phân tích protein cho thấy, antiA_scFv được tổng hợp ở bất kỳ giai đoạn nào từ đầu, giữa, cuối pha tăng trưởng tế bào (hình 6b). Năng suất biểu hiện của antiA_scFv không chênh lệch nhiều ở các thời điểm cảm ứng từ $OD_{600} = 0,4-3$. Hàm lượng antiA_scFv nhiều nhất được quan sát tại thời điểm OD cảm ứng là 1,5 và bắt đầu giảm khi thời điểm cảm ứng lên đến $OD_{600} = 3,5$ và 4.

Mật độ tế bào thu được tăng theo thời điểm cảm ứng, tăng từ $OD = 0,4-3,5$ và bắt đầu giảm khi OD cảm ứng lên đến 4 (hình 6a). Mật độ tế bào thu được khi cảm ứng ở $OD_{600} = 3,5$ cao nhất đạt 25,56. Tuy nhiên, sự tích lũy của protein ngoại lai kém hơn so với thời điểm cảm ứng sớm hơn (lúc $OD_{600} = 1,5$) đạt $OD_{600} = 17,02$. Theo như những nghiên cứu trước đây, sự tổng hợp của protein tăng khi cảm ứng ở các giai đoạn tế bào tăng trưởng theo cấp số nhân và giảm khi tế bào phát triển đến giai đoạn ổn định (Li et al., 2002), điều này phù hợp với nghiên cứu của

chúng tôi. Như vậy, dựa vào thông số mật độ tế bào thu mẫu và kết quả kiểm tra mức độ biểu hiện của antiA_scFv, chúng tôi thấy rằng nên lựa chọn thời điểm cảm ứng lúc $OD_{600} = 1,5$ để có năng suất protein đích thu được cao nhất

KẾT LUẬN

Nghiên cứu nhằm tối ưu các điều kiện biểu hiện gen *antiA_scFv* như sau: môi trường TB, nồng độ chất cảm ứng IPTG là 0,1 mM, nhiệt độ biểu hiện antiA_scFv thích hợp nhất ở 30°C và thời điểm cảm ứng nên tiến hành trong giai đoạn sinh trưởng của tế bào theo cấp số nhân, ở nghiên cứu này thời điểm cảm ứng tiến hành khi $OD_{600} = 1,5$. Như vậy, sau tối ưu mật độ tế bào tăng gấp 5,2 lần và năng suất thu hồi protein scFv tăng đáng kể so với điều kiện ban đầu.

Lời cảm ơn: Bài báo được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam “Nghiên cứu tạo kháng thể đơn chuỗi tái tổ hợp nhận biết đặc hiệu kháng nguyên nhóm máu”, mã số VAST02.03/15-16.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ahmad Z. A., Yeap S. K., Ali A. M., Ho W. Y., Alitheen N. B. M., Hamid M., 2012. scFv

- Antibody: Principles and Clinical Application. *J. Immunol. Res.*, e980250.
- Akbari V., Sadeghi H. M. M., Jafarian-Dehkordi A., Chou C. P., Abedi D., 2015. Optimization of a single-chain antibody fragment overexpression in *Escherichia coli* using response surface methodology. *Res. Pharm. Sci.*, 10: 75-83.
- Alvarez-Rueda N., Ladjemi M. Z., Béhar G., Corgnac S., Pugnère M., Roquet F., Bascoul-Mollevis C., Baty D., Pèlerin A., Navarro-Teulon I., 2009. A llama single domain anti-idiotypic antibody mimicking HER2 as a vaccine: Immunogenicity and efficacy. *Vaccine*, 27: 4826-4833.
- Chan C. E. Z., Lim A. P. C., Chan A. H. Y., MacAry P. A., Hanson B. J., 2010. Optimized Expression of Full-Length IgG1 Antibody in a Common *E. coli* Strain. *PLoS ONE*, 5: e10261.
- Chester K., Pedley B., Tolner B., Violet J., Mayer A., Sharma S., Boxer G., Green A., Nagl S., Begent R., 2004. Engineering Antibodies for Clinical Applications in Cancer. *Tumor Biol.*, 25: 91-98.
- Farewell A., Neidhardt F. C., 1998. Effect of Temperature on In Vivo Protein Synthetic Capacity in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 180: 4704-4710.
- Laemmli U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Larentis A. L., Argondizzo A. P. C., Esteves G. dos S., Jessouron E., Galler R., Medeiros M. A., 2011. Cloning and optimization of induction conditions for mature PsaA (pneumococcal surface adhesin A) expression in *Escherichia coli* and recombinant protein stability during long-term storage. *Protein Expr. Purif.*, 78: 38-47.
- Li C., Bai J., Cai Z., Ouyang F., 2002. Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. *J. Biotechnol.*, 93: 27-34
- Malakar P., Venkatesh K. V., 2012. Effect of substrate and IPTG concentrations on the burden to growth of *Escherichia coli* on glycerol due to the expression of Lac proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93: 2543-2549.
- Santala V., Lamminmäki U., 2004. Production of a biotinylated single-chain antibody fragment in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J. Immunol. Methods*, 284: 165-175.
- Studier F. W., Rosenberg A. H., Dunn J. J., Dubendorff J. W., 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*, 185: 60-89.
- Yuan R., Chen X., Chen Y., Gu T., Xi H., Duan Y., Sun B., Yu X., Jiang C., Liu X., Wu C., Kong W., Wu Y., 2013. Preparation and diagnostic use of a novel recombinant single-chain antibody against rabies virus glycoprotein. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98: 1547-1555.

**SELECTION OF FERMENTATION CONDITION FOR EXPRESSION OF
RECOMBINANT SINGLE CHAIN ANTIBODY RECOGNIZING THE ANTIGEN
OF BLOOD TYPE A IN *Escherichia coli***

Dang Thi Ngoc Ha, Nguyen Thi Trung, Le Thi Thu Hong, Do Thi Huyen, Truong Nam Hai*

Institute of Biotechnology, VAST

SUMMARY

Single chain recombinant antibody identifying blood group A antigen in the ABO system (antiA_scFv) was constructed to express in *E. coli*. In this study, we optimized fermentation conditions to increase the yield of antiA_scFv expression as well as to reduce cost and save culture time. The results showed that the antiA_scFv expression was highest in the culture TB medium with 0.1 mM IPTG, at 30°C. Induction time point was in exponential growth phase of cells at the cell density $OD_{600} = 1.5$. With the selected fermentation conditions, the cell biomass increased 5.2 times (from $OD_{600} = 3.27$ to $OD_{600} = 17.02$) and antiA_scFv yield increased significantly as compared to the initial conditions.

Keywords: *Escherichia coli*, blood group A antigen, single chain recombinant antibody.

Citation: Dang Thi Ngoc Ha, Le Thi Thu Hong, Do Thi Huyen, Truong Nam Hai, 2017. Selection of fermentation condition for expression of recombinant single chain antibody recognizing the antigen of blood type a in *Escherichia coli*. Tap chi Sinh hoc, 39(2): 191-198. DOI: [10.15625/0866-7160/v39n2.8485](https://doi.org/10.15625/0866-7160/v39n2.8485).

*Corresponding author: tnhai@ibt.ac.vn

Received 11 July 2016, accepted 20 March 2017