

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

**Đinh Thị Bích Lân¹, Phùng Thăng Long², Lê Đức Thọ¹,
Lê Quốc Việt¹, Hoàng Thị Thùy Nhung¹, Đặng Thị Hương¹,
Lê Công Thịnh¹, Huỳnh Văn Chương¹, Đặng Thanh Long¹, Nguyễn Thị Thu Hiền³**

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm cải thiện mức độ biểu hiện kháng nguyên tái tổ hợp LTA trong tế bào *E. coli*, chủng BL21 (DE3) mang gen *eltA* của vi khuẩn *E. coli*. Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường nuôi cấy YJ cho khả năng sinh trưởng tốt nhất với tỷ lệ tiếp giống là 1% (OD600 = 0,8), lắc 200 vòng/phút ở 37°C sau 8 giờ nuôi cấy. Mức độ biểu hiện của protein dung hợp 6xHis-LTA cũng cho kết quả tốt nhất trên môi trường YJ trong cùng điều kiện tối ưu (nồng độ chất cảm ứng Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 0,8 mM, lắc 200 vòng/phút, nhiệt độ cảm ứng 25°C trong thời gian 12 giờ). Sắc ký lọc gel 6xHis cho thấy sản phẩm protein dung hợp 6xHis-LTA có khối lượng phân tử khoảng 30 kDa.

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

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

**Đinh Thị Bích Lân, Phùng Thăng Long, Lê Đức Thọ,
Lê Quốc Việt, Hoàng Thị Thùy Nhung, Đặng Thị Hương,
Lê Công Thịnh, Huỳnh Văn Chương, Đặng Thanh Long, Nguyễn Thị Thu Hiền**

SUMMARY

Improvement of the recombinant protein expression level in *E. coli* strain BL21 (DE3) encoding gene *eltA* of *E. coli* was conducted. The studied results showed that YJ medium had given the best growth of *E. coli* BL21 (DE3) in comparison with other media in the same 1% initial seed inoculum size (OD600 = 0.8), shaking 200 rpm at 37°C for 8 hours. The highest level of fusion protein (6xHis-LTA) was obtained from YJ medium in the same optimum culture condition (0.8 mM Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 12 hours at 25°C). Molecular weight of purified 6xHis-LTA protein from 6xHis affinity chromatography was about 30 kDa.

Keywords: fusion protein, LTA, 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 [8]. 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) [7]. 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 LTA và LTB, sử dụng trong phòng và trị bệnh do *E. coli* gây ra

¹. Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

². Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

³. Trường Đại học Kinh tế Nghệ An.

là cần thiết. Trong nghiên cứu trước, chúng tôi đã tạo dòng và biểu hiện thành công gen *eltA* trong tế bào *E.coli* BL21(DE3) [3]. Tuy nhiên, để sản xuất protein LTA tái tổ hợp chất lượng cao với giá thành thấp, cần tiến hành nghiên cứu nhằm cải thiện quy trình biểu hiện protein tái tổ hợp. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá mức độ biểu hiện protein tái tổ hợp LTA của vi khuẩn *E. coli* mang gen *eltA* 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 LTA 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 LTA do chúng tôi tự thiết kế và chế tạo [3].

- Các loại môi trường nuôi cấy LB, SOB, SOC, TB, YJ, M9ZB, HSG [2], 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 kháng nguyên LTA 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 μ g/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 4°C 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 4°C. Protein tái tổ hợp LTA 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 *eltA* mã hóa protein LTA trong các loại môi trường khác nhau

Chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy chủng *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp mang gen *eltA* mã hóa protein LTA trên các môi trường khác nhau (LB, TB, SOC, SOB và YJ) trong cùng điều kiện (tỷ lệ tiếp giống 1%, sinh trưởng ở 37°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút). Sau 10 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.

Bảng 1. Sinh trưởng của chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang gen *eltA* mã hóa protein LTA ở các môi trường khác nhau

Môi trường	Mật độ tế bào OD600
LB	2,577 ^c
TB	2,655 ^b
YJ	2,880 ^a
SOC	1,479 ^e
SOB	2,413 ^d

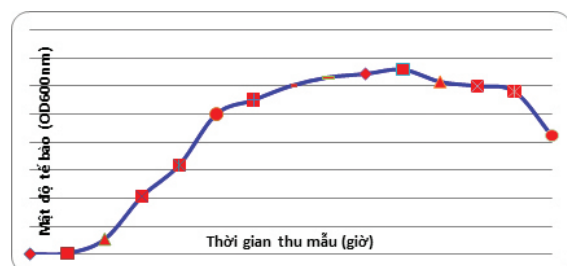
Chú thích: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo Duncan's test ($p < 0,05$)

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, môi trường YJ cho mật độ tế bào cao nhất ($OD_{600} = 2,880$; $p < 0,05$), tiếp đến là các môi trường LB và TB. Môi trường SOC cho mật độ tế bào thấp nhất ($OD_{600} = 1,479$).

Môi trường YJ đã được nhiều tác giả sử dụng trong nuôi cấy sinh khối *E. coli* trước khi sản xuất các protein tái tổ hợp. Chẳng hạn, Karbalaie-Heidari H.R. và cs. đã sử dụng môi trường YJ để biểu hiện gen zinc-metalloprotease của *Salinivibrio* sp. AF-2004 [9].

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 LTA trong 50 ml môi trường YJ có bổ sung 50 μ g/ml kanamycin ở nhiệt độ 37°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút, tỷ lệ tiếp giống là 0,1% (v/v, $OD_{600} = 1$) trong thời gian nuôi 28 giờ. Mật độ tế bào được đo ở OD_{600} tại các thời điểm 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 và 28 giờ nuôi. Đường cong sinh trưởng được xây dựng bằng phần mềm Excel 2007 để tìm thời gian nuôi cấy tối ưu.



Hình 1. Đường cong sinh trưởng của chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang gen *eltA*

Đường cong sinh trưởng của tế bào được trình bày ở hình 1 cho thấy 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. Sau 20 giờ nuôi cấy, mật độ tế bào cho giá trị OD_{600} cao nhất, tế bào tăng trưởng mạnh nhất là trong khoảng thời gian từ 8-10 giờ.

Kết quả nghiên cứu này tương tự với kết quả nghiên cứu trước đây của chúng tôi trên chủng *E. coli* BL21 (DE3) chứa vector tái tổ hợp mang gen Cp23 [1], và kết quả của Nguyễn Hoàng Lộc và cs. khi khảo sát đường cong sinh trưởng của chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang gen tái tổ hợp *faeG* mã hóa cho kháng nguyên bám dính K88 [4].

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 (OD_{600}) sau 10 giờ nuôi vi khuẩn trong cùng điều kiện (nhiệt độ, tốc độ lắc, môi trường YJ), nhưng khác nhau về tỷ lệ tiếp giống ban đầu. Kết quả trình bày ở bảng 2 cho thấy khi nuôi trong cùng điều kiện thì tỷ lệ tiếp giống 1% cho kết quả tốt nhất, mật độ tế bào cho giá trị OD_{600} là 2,524.

Bảng 2. Sinh trưởng của chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang gen *eltA* mã hóa protein LTA ở các tỷ lệ tiếp giống khác nhau

Tỷ lệ tiếp giống (%)	Mật độ tế bào (OD_{600})
0,1	1,957 ^e
0,5	2,276 ^c
1	2,524 ^a
2	2,463 ^b
3	2,321 ^c
4	2,279 ^c
5	2,220 ^d

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

3.4. Tốc độ lắc tối ưu

Chúng tôi tiếp tục 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 LTA được nuôi trong môi trường YJ với tỷ lệ tiếp giống là 1%, nhiệt độ nuôi 37°C. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Sinh trưởng của chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang gen *eltA* mã hóa protein LTA ở các tốc độ lắc khác nhau

Tốc độ lắc (Vòng/phút)	Mật độ tế bào (OD600)
150	2,372 ^c
180	2,590 ^b
200	2,880 ^a
220	2,082 ^e
250	2,183 ^d

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

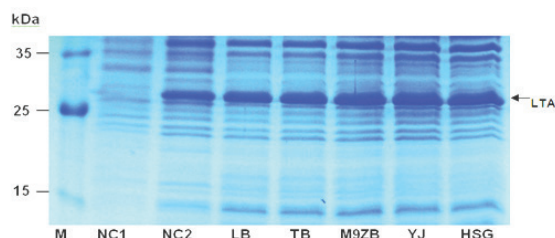
Kết quả ở bảng 3 cho thấy ở các tốc độ lắc khác nhau thì mật độ tế bào sau 10 giờ nuôi cấy sẽ khác nhau và đạt cực đại ở tốc độ lắc 200 vòng/phút (OD600 = 2,880), với tốc độ lắc cao hơn thì mật độ tế bào bắt đầu giảm (từ 220 vòng/phút đến 250 vòng/phút).

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: biểu hiện protein GP41 của virus HIV [6], protein 3-1E của *Eimeria* [2].

3.5. Môi trường biểu hiện tối ưu

Khả năng biểu hiện của protein dung hợp 6xHis-LTA được khảo sát trên 5 loại môi trường với các thành phần khác nhau (LB, YJ, TB, HSG và M9ZB cải tiến). Thí nghiệm được tiến hành trong cùng một điều kiện (cảm ứng với 0,8 mM IPTG, lắc 200 vòng/phút ở 37°C trong thời gian cảm ứng là 8 giờ). Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy môi trường YJ cho kết quả biểu hiện kháng nguyên tái tổ hợp LTA tốt nhất, tiếp đến là môi trường HSG và M9ZB cải tiến, môi trường LB và TB cho hàm lượng kháng nguyên thấp hơn các môi trường YJ, HSG và M9ZB (Hình 2). Nguyễn Hoàng Lộc và cs (2014) cho

thấy môi trường thích hợp cho sự biểu hiện của kháng nguyên bám dính K88-1NT là M9ZB cải tiến [4]. Đinh Thị Bích Lân và cs. (2016) cho thấy kháng nguyên 3-1E biểu hiện trong môi trường LB mạnh hơn so với các môi trường TB, YJ, SOB và SOC [2].

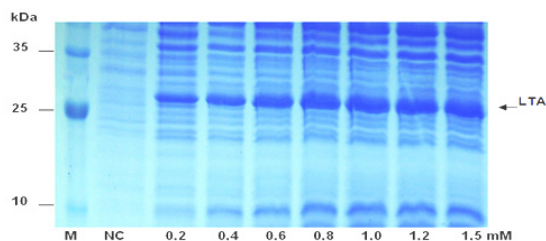


Hình 2. Ảnh hưởng của môi trường lên mức độ biểu hiện protein tái tổ hợp LTA

*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. M9ZB, HSG, LB, YJ, TB: *E. coli* mang vector tái tổ hợp được cảm ứng IPTG trong các môi trường M9ZB; HSG; LB; YJ và TB.*

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 LTA trên môi trường YJ với nhiệt độ cảm ứng 37°C, lắc 200 vòng/phút trong thời gian 10 giờ, chúng tôi sử dụng IPTG với các nồng độ 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2 và 1,5 mM. Kết quả điện di trên gel SDS-PAGE 15% cho thấy kháng nguyên tái tổ hợp LTA bắt đầu tổng hợp khi bổ sung với 0,2 mM IPTG, đạt giá trị cao tương đương nhau ở các nồng độ IPTG từ 0,8 đến 1,5 mM. Vì vậy, nồng độ 0,8 mM IPTG là nồng độ tối ưu cho biểu hiện protein LTA (Hình 3). Kết quả này tương đương với kết quả nghiên cứu của Lu và cs. (2015) khi tối ưu các điều kiện biểu hiện IFN-CSP trong tế bào *E. coli* BL21 với vector biểu hiện là pET-21b [11].

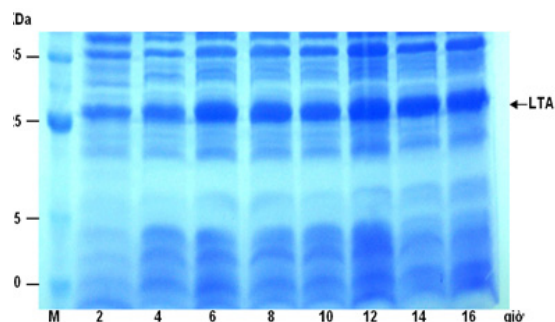


Hình 3. Kết quả biểu hiện protein LTA tái tổ hợp khi được cảm ứng bởi IPTG ở các nồng độ khác nhau

M: khối lượng thang chuẩn protein (10-170 kDa, Bio-Base). NC: *E. coli* không mang vector tái tổ hợp, không được cảm ứng. 0,2- 1,5 mM: *E. coli* mang vector tái tổ hợp được cảm ứng bởi IPTG ở các nồng độ 0,2- 1,5 mM.

3.7. Thời gian cảm ứng tối ưu

Chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian cảm ứng IPTG khác nhau (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 và 16 giờ) lên mức độ biểu hiện protein LTA trong cùng điều kiện (0,8 mM IPTG, lắc 200 vòng/phút, nhiệt độ cảm ứng 37°C). Kết quả điện di trên gel SDS-PAGE 15% cho thấy thời gian cảm ứng 12 giờ cho nồng độ protein LTA tái tổ hợp cao nhất (hình 4).



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian cảm ứng lên biểu hiện kháng nguyên tái tổ hợp LTA

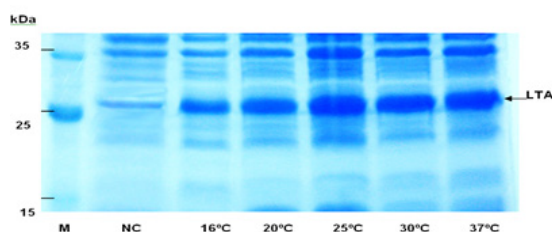
M: khối lượng thang chuẩn protein (10-170 kDa, Bio-Base). 2- 16: là thời gian cảm ứng IPTG.

3.8. Nhiệt độ cảm ứng tối ưu

Để xác định nhiệt độ cảm ứng tối ưu, sau khi

đã nuôi tăng sinh *E. coli* ở 37°C đến khi mật độ tế bào đạt giá trị OD600 = 0,8, chúng tôi đã tiến hành cảm ứng IPTG ở các nhiệt độ khác nhau (16, 20, 25, 30 và 37°C) trong 12 giờ và trong cùng các điều kiện cảm ứng (môi trường biểu hiện YJ, tốc độ lắc 200 vòng/phút và nồng độ chất cảm ứng IPTG là 0,8mM), thu protein tái tổ hợp và điện di SDS-PAGE 15%.

Kết quả điện di (hình 5) cho thấy lượng protein thu được ít nhất khi tiến hành cảm ứng ở 16°C, lượng protein tăng cao hơn ở 20°C và cao nhất ở 25°C. Lượng protein vẫn duy trì ở mức cao khi nhiệt độ cảm ứng là 30°C và 37°C, tuy nhiên ở mức thấp hơn so với 25°C. Vì thế chúng tôi chọn nhiệt độ 25°C là nhiệt độ tối ưu để biểu hiện protein LTA trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3). Kết quả này tương đương với kết quả của Văn Thị Như Ngọc và cs. (2007) khi biểu hiện gen HA5-1 mã hóa tiểu phần kháng nguyên Haemagglutinin của virus cúm A H5N1 trong tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21 [5].



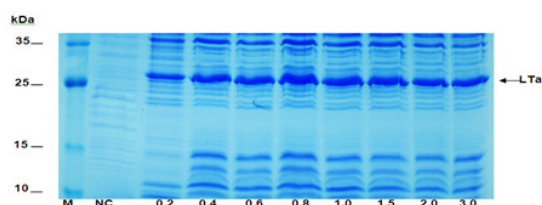
Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ cảm ứng lên sản xuất protein tái tổ hợp LTA

M: khối lượng thang chuẩn protein (10-170 kDa, Bio-Base). NC: *E. coli* không mang vector tái tổ hợp sinh trưởng ở 37°C; 16°C- 37°C: *E. coli* mang vector tái tổ hợp được cảm ứng ở 16°C - 37°C.

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 LTA, chúng

tôi đã nuôi vi khuẩn mang vector tái tổ hợp 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 0,2-3). Kết quả cho thấy khả năng sinh tổng hợp protein LTA đạt giá trị cao nhất nếu bổ sung chất cảm ứng vào thời điểm mật độ tế bào vi khuẩn đạt OD600 là 0,8 (hình 6). Kigawa và cs cũng xác định thời điểm thích hợp nhất để cảm ứng biểu hiện endoglucanase chịu nhiệt từ *Clostridium thermocellum* là OD600 từ 0,8-1 [10].

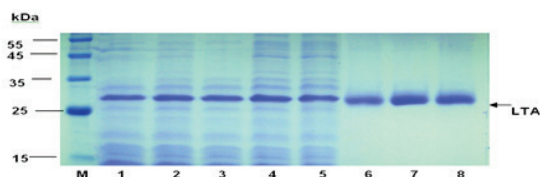


Hình 6. Ảnh hưởng của mật độ tế bào tại thời điểm bổ sung chất cảm ứng IPTG lên khả năng biểu hiện protein LTA

M: khối lượng thang chuẩn protein (10-170 kDa). NC: *E. coli* không mang vector tái tổ hợp; 0,2- 3,0: 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 LTA tái tổ hợp

Sau khi đã xác định được điều kiện nuôi cấy và biểu hiện tối ưu, chúng tôi tiến hành nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* BL21 tái tổ hợp mang gen *eltA* trong 400 ml môi trường YJ có bổ sung Kanamycin (50 µg/ml), nhiệt độ nuôi cấy 37°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút, khi mật độ tế bào vi khuẩn đạt OD600 = 0,8 thì tiến hành cảm ứng với 0,8 mM IPTG, nuôi lắc 200 vòng/phút ở 25°C trong thời gian 12 giờ. Dịch thu được sau khi phá vỡ tế bào có chứa kháng nguyên tái tổ hợp LTA được lọc bằng gel ProBond™ Purification System Kit (Invitrogen, USA). Độ tinh sạch của protein được thể hiện trong kết quả điện di (hình 7).



Hình 7. Kháng nguyên LTA thu được sau tinh sạch bằng gel ProBond™ Nickel-Chelating Resin

M: khối lượng thang chuẩn protein (10-170 kDa, Bio-Base). 1-5: *E. coli* mang vector tái tổ hợp cảm ứng với 0,8 mM IPTG qua các lần khác nhau. 6-8: protein tái tổ hợp LTA sau khi lọc qua gel.

IV. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tối ưu hóa được quy trình sản xuất kháng nguyên tái tổ hợp LTA ở quy mô phòng thí nghiệm. Môi trường nuôi cấy YJ cho khả năng sinh trưởng tốt nhất với tỷ lệ tiếp giống 1% (OD600 = 0,8), lắc 200 vòng/phút ở 37°C sau 8 giờ nuôi cấy. Mức độ biểu hiện của protein dung hợp 6xHis-LTA cũng cho kết quả tốt nhất trên môi trường YJ, nồng độ chất cảm ứng IPTG 0,8 mM, nuôi lắc ở 200 vòng/phút, nhiệt độ cảm ứng 25°C trong thời gian 12 giờ. Sắc ký lọc gel cho thấy sản phẩm protein dung hợp 6xHis-LTA có khối lượng phân tử khoảng 30 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

- Đinh Thị Bích Liên, Phùng Thăng Long, Nguyễn Hoàng Lộc, Hoàng Tấn Quảng, Trần Thúy Lan, Lê Quốc Việt, Đặng Thanh Long, Lê Công Thịnh, Huỳnh Văn Chương, Đặng Thị Thu Giang (2014). Cải thiện mức độ biểu hiện kháng nguyên tái tổ hợp *Cryptosporidium parvum* Cp23 trong *E. coli*

- BL21 (DE3). *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, tập XXI (6), trang 35-42.
2. Đinh Thị Bích Lâm, Phùng Thăng Long, Huỳnh Văn Chương, Đặng Thanh Long, Hoàng Tấn Quảng, Lê Đức Thọ, 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.
 3. Đinh Thị Bích Lâm, Đặng Thanh Long, Lê Công Thịnh, Phùng Thăng Long, Hoàng Thị Thùy Nhung, Lê Quốc Việt (2017). Nghiên cứu tạo dòng và biểu hiện gen *eltA* của *E. coli* gây tiêu chảy ở lợn. *Tạp chí khoa học Đại học Huế* (Nông nghiệp và Phát triển nông thôn), 2017, Tập: 126, Số: 3A, Trang: 169-178.
 4. Nguyễn Hoàng Lộc, Nguyễn Thị Khánh Quỳnh, Hoàng Tấn Quảng, Trần Thúy Lan, Lê Mỹ Tiểu Ngọc, Đinh Thị Bích Lâm, 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.
 5. Văn Thị Như Ngọc, Đỗ Thị Huyền, Nguyễn Thanh Nhân, Nguyễn Phước Hải, Trương Văn Dung, Trương Nam Hải (2007). Biểu hiện gen HA5-1 mã hóa tiểu phần kháng nguyên Haemagglutinin (HA) của virus cúm A H5N1 trong *Escherichia coli*, *Tạp chí công nghệ sinh học*, Tập 5, (3), tr. 313-320.
 6. Bạch Thị Như Quỳnh, Vũ Thị Hiền, Hà Thị Thu, Nguyễn Thị Hoa, Lê Phương Hằng, Nguyễn Thanh Tùng, Nguyễn Xuân Bắc, Đồng Văn Quyền, Lê Văn Phụng, Đinh Duy Kháng (2011). Biểu hiện protein GP41 của virus HIV phân type CRF01_AE trong *E. coli* và ứng dụng để phát hiện kháng thể kháng HIV trong huyết thanh bệnh nhân bằng Western blot và Elisa, *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 9 (1), tr. 29-36.
 7. 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.
 8. 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.
 9. Karbalaeei-Heidari H.R., Ziaee A.A., Amoozegar M.A., Cheburkin Y., Budisa N. (2008). Molecular cloning and sequence analysis of a novel zinc-metalloprotease gen from the *Salinivibrio* sp. strain AF-2004 and its extracellular expression in *E. coli*. *Gen*, 408, pp. 196-203.
 10. 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, pp. 63-68.
 11. Lu, X., Wang, J., Jin, X., & Zhu, J. (2015). High-level expression of a novel liver-targeting fusion interferon with preferred *Escherichia coli* codon preference and its anti-hepatitis B virus activity *in vivo*, *BMC biotechnology*, 15(1), pp. 54.

Ngày nhận 26-11-2017

Ngày phản biện 18-6-2018

Ngày đăng 1-7-2018