

Tạo và đánh giá khả năng bám định hướng của protein dung hợp giữa nitrocellulose-binding anchor protein với protein A và thử ứng dụng

Trần Nguyễn Thảo Thương, Nguyễn Phước Khải Hoàn, Trần Văn Hiếu*



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

TÓM TẮT

Các dụng cụ chẩn đoán nhanh tại chỗ hiện đang được quan tâm nghiên cứu và phát triển. Trong đó que thử nhanh Lateral Flow Test (LFT) là dụng cụ chẩn đoán tại chỗ có nhiều ứng dụng rộng rãi và đa dạng. Chính vì thế việc tối ưu hóa độ nhạy của một que thử nhanh là một yêu cầu cần thiết. Cố định kháng thể trên màng nitrocellulose là bước quan trọng trong việc tăng độ nhạy que thử LFT nhằm phát hiện kháng nguyên mục tiêu. Trong nghiên cứu này, protein dung hợp giữa protein 3-helix, một protein có khả năng bám lên màng nitrocellulose nhanh và mạnh, và protein A, một protein có thể bám đặc hiệu với đuôi Fc của kháng thể IgG đã được tạo ra. Protein này được hy vọng sẽ giúp kháng thể IgG được cố định chặt lên màng nitrocellulose với đầu Fab hướng lên, từ đó tăng khả năng bắt kháng nguyên mục tiêu. Chúng tôi đã tạo lần lượt vector tái tổ hợp pET22b-proA, pET22b-proA-3-helix. Protein A và A-3-helix được cảm ứng biểu hiện bởi IPTG và xác nhận bằng SDS-PAGE và Western blot. Protein A và A-3-helix được tinh sạch với độ tinh sạch trên 90%. Các protein mục tiêu sau khi tinh sạch được sử dụng để đánh giá khả năng bám định hướng lên màng nitrocellulose bằng thử nghiệm rửa trôi cùng với thử nghiệm bắt giữ kháng thể. Kết quả cho thấy, protein A-3-helix có khả năng bám màng nitrocellulose tốt hơn protein A và có khả năng cố định kháng thể. Các kết quả đạt được giúp đặt nền móng cho việc ứng dụng protein dung hợp trong việc cố định một cách định hướng kháng thể trong que thử nhanh.

Từ khóa: kháng thể, protein A, protein 3-helix, que thử nhanh

GIỚI THIỆU

Việc chẩn đoán bằng que thử nhanh đang là công nghệ được quan tâm hiện nay bởi những ưu điểm như phù hợp cho việc chẩn đoán tại chỗ thí dụ có thể thực hiện tại nhà, giá thành rẻ, cho kết quả nhanh và không yêu cầu người thực hiện có trình độ cao trong việc sử dụng¹. Kể từ khi que thử nhanh được tung ra thị trường vào năm 1988 để thử thai, hiện nay que thử được ứng dụng rộng rãi trong việc phân tích phát hiện bệnh ở người và động vật, phát hiện các chất ô nhiễm trong môi trường cũng như các chất tồn đọng trong sản phẩm nông nghiệp, phát hiện việc lạm dụng thuốc....^{2,3}. Một que thử nhanh hoạt động dựa trên sự di chuyển của dòng chảy mang phân tử mục tiêu đã được cố định trên một màng xốp đến phân tử cần phát hiện. Cấu tạo của que thử nhanh gồm bốn phần: vùng nhận mẫu, vùng phức hợp, vùng màng và vùng hút⁴. Vùng màng giữ vai trò quan trọng vì nó phản ánh kết quả của thử nghiệm của que thử nhanh. Hiện nay, màng nitrocellulose được sử dụng phổ biến trong việc cấu tạo vùng màng của que thử nhanh. Que thử nhanh có nhiều ưu điểm cho mục tiêu sản xuất công nghiệp với giá thành rẻ. Tuy nhiên que

thử nhanh có nhược điểm như chỉ cho kết quả định tính, độ nhạy thường thấp hơn các kỹ thuật tiêu chuẩn (PCR, ELISA...), thường yêu cầu bổ sung thêm mẫu đầu vào vì thế độ tin cậy chưa cao. Việc cải thiện độ nhạy của que thử là một yêu cầu cần thiết để phát triển que thử nhanh. Độ nhạy của que thử được quyết định chủ yếu ở khả năng bám của các phân tử để phát hiện mục tiêu, thường là kháng thể, lên trên bề mặt màng nitrocellulose. Chính vì thế việc tăng cường khả năng bám dính của protein (kháng thể) lên màng nitrocellulose thông qua việc cố định protein lên màng nitrocellulose là một giải pháp để cải thiện độ nhạy của que thử. Ngoài ra, vị trí lập thể của kháng thể trên màng nitrocellulose cũng là yếu tố quan trọng đến hiệu quả liên kết giữa kháng nguyên và kháng thể. Kháng thể khi được cố định ngẫu nhiên lên bề mặt màng thường tồn tại ba vị trí lập thể: (i) đầu Fc của kháng thể hướng về phía màng, (ii) đầu Fab hướng về phía màng, (iii) kháng thể nằm ngang trên bề mặt màng. Cố định định hướng đầu Fc của kháng thể lên màng nitrocellulose là vị trí cho liên kết giữa kháng nguyên và kháng thể cao nhất. Protein A, protein bề mặt của vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, đã được chứng minh có khả

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Liên hệ

Trần Văn Hiếu, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Email: tvhieu@hcmus.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 10-5-2021
- Ngày chấp nhận: 30-10-2021
- Ngày đăng: 25-12-2021

DOI: 10.32508/stdjns.v5i4.1064



Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Trích dẫn bài báo này: Thương T N T, Hoàn N P K, Hiếu T V. Tạo và đánh giá khả năng bám định hướng của protein dung hợp giữa nitrocellulose-binding anchor protein với protein A và thử ứng dụng. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 5(4):1713-1720.

năng giúp định hướng đầu Fc của kháng thể^{5,6}. Với mục tiêu tăng cường tính bám dính của kháng thể lên bề mặt màng nitrocellulose, protein A được dung hợp với protein 3-helix, một nitrocellulose-binding anchor protein, được thiết kế bởi David Barker và cộng sự⁷. Protein này đã được chứng minh có khả năng hấp thụ mạnh lên màng nitrocellulose với mức năng lượng lý tưởng và cấu trúc siêu ổn định nhờ vào cấu trúc của nó gồm 3 chuỗi xoắn với các acid amine tích điện tập trung nhiều ở bên ngoài cấu trúc xoắn. Đặc biệt, với 25% lysine trong tổng số acid amine đã giúp protein này hình thành nên một bề mặt tích điện dương thích hợp để gắn kết vào bề mặt màng nitrocellulose tích điện âm. Protein dung hợp giữa 3-Helix và protein A đã đáp ứng được yêu cầu cần gia tăng khả năng cố định kháng thể lên màng nitrocellulose đồng thời giúp định hướng đầu Fab của kháng thể hướng lên trên bề mặt màng nitrocellulose. Phương pháp này giúp gia tăng số lượng kháng thể cũng như khả năng bắt kháng nguyên của kháng thể từ đó nâng cao hiệu quả của que thử. Ngoài ra, protein dung hợp giữa 3-Helix protein và protein A còn tạo nền tảng giúp định hướng bất kì kháng thể nào có ái lực với protein A, từ đó cho thấy tiềm năng ứng dụng của phương pháp cố định kháng thể thông qua protein dung hợp giữa 3-Helix và protein A.

Để đạt được mục tiêu trên, việc tạo protein tái tổ hợp dung hợp giữa protein A và protein 3-helix và đánh giá khả năng bám cũng như khả năng cố định kháng thể thông qua các thử nghiệm dòng chảy đã được thực nghiệm. Các kết quả đạt được giúp đặt nền móng cho việc ứng dụng protein dung hợp trong việc cố định một cách định hướng kháng thể trong que thử nhanh cũng như các công cụ xét nghiệm tại chỗ.

PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật, hóa chất

E. coli strain DH5 α [F- endA1 hsdR17 (rk-mksupE44 thi λ -recA1 gyrA96 Δ lacU169 (ϕ 80 lacZ Δ M15)] được sử dụng để dòng hóa gene, *E. coli* strain BL21 (DE3) (F+ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm(DE3)) được sử dụng để biểu hiện. Plasmid pET22b mang gene kháng ampicillin và T7 promoter cho phép biểu hiện protein mục tiêu trong tế bào chất của *E. coli*. Bộ gene của *Staphylococcus aureus* được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR thu nhận gene mã hóa cho protein A, gene mã hóa cho protein 3-helix được tối ưu hoá cho việc biểu hiện trong *E. coli* và mỗi được tổng hợp PhuSa Biochem, Việt Nam.

EZ-10 Spin Column DNA Minipreps Kit (Biobasic), HisTrap HP 5 mL affinity chromatography column (GE healthcare), enzymes (Thermo Scientific), anti-6xHis tag clone H3 (Santa Cruz).

Dòng hóa plasmid pET22b-proA và pET22b-proA-3-helix

Quy trình tạo dòng *E. coli* DH5 α mang plasmid tái tổ hợp pET22b-proA được thực hiện như sau: thu nhận gene *proA* mã hóa protein A bằng phương pháp PCR từ khuôn là bộ gene vi khuẩn *Staphylococcus aureus*. Chương trình thực hiện PCR: 95°C/5¢; 30 chu kỳ: 95°C/15², 55°C/30², 72°C/10²; kết thúc: 72°C/10¢. Sản phẩm PCR được xử lý với enzyme *Bam*HI và *Nde*I để tạo đầu dính; thực hiện phản ứng nối gene *proA* vào pET22b đã được cắt mở vòng bằng hai enzyme tương ứng để hình thành plasmid tái tổ hợp pET22b-proA. Plasmid pET22b-proA được biến nạp vào *E. coli* DH5 α bằng phương pháp biến nạp calcium lạnh. Dòng tế bào *E. coli* DH5 α mang plasmid tái tổ hợp pET22b-proA được sàng lọc trên môi trường LB agar chứa ampicillin nồng độ cuối là 100 μ g/mL (LB-Amp100) và kiểm tra dòng mục tiêu bằng PCR khuẩn lạc với cặp mỗi T7 promoter và T7 terminator. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel 1,5% agarose. Sau khi dòng hóa thành công plasmid pET22b-proA, gene mã hóa cho protein 3-helix được chèn vào plasmid pET22b-proA để cấu trúc nên plasmid pET22b-proA-3-helix. Gene 3-helix được thu nhận bằng phương pháp PCR sử dụng mỗi 3HF HindIII và 3HR XhoI. Chương trình dòng hóa tương tự như khi dòng hóa plasmid pET22b-proA.

Hai plasmid pET22b-proA, pET22b-proA-3-helix sau khi được dòng hóa thành công được giải trình tự với kit BigDyeTM Terminator (MacroGen Inc., Hàn Quốc). Kết quả giải trình tự được so sánh độ tương đồng với trình tự lý thuyết bằng phần mềm Jellyfish.

Biểu hiện protein A và protein A-3-helix

Các plasmid tái tổ hợp pET22b-proA, pET22b-proA-3-helix sau khi xác định trình tự được biến nạp vào *E. coli* BL21(DE3). Dòng tế bào *E. coli* BL21(DE3) mang plasmid tái tổ hợp được sàng lọc trên môi trường LB-Amp100. Những khuẩn lạc nào mọc được trên môi trường này đã được lựa chọn để cảm ứng với IPTG mục đích kiểm tra sự biểu hiện protein mục tiêu. Các khuẩn lạc mang plasmid mục tiêu được hoạt hóa qua đêm trong ống nghiệm 5 mL LB Amp100 ở 37 °C. Sau đó được cấy chuyển với tỉ lệ 1:10, lắc với tốc độ 250 rpm ở 37 °C cho đến khi giá trị OD 600 nm đạt tới 0,6-0,8. Sau đó bổ sung vào môi trường IPTG có nồng độ cuối là 0,5 mM. Sau đó ở 25°C, sau 6 giờ, thu sinh khối hòa tan vào dung dịch PBS và tiến hành phá tế bào, thu nhận pha tổng, tan tủa và thực hiện điện di SDS-PAGE để kiểm tra biểu hiện và xác nhận lại bằng phương pháp Western Blot với kháng thể kháng 6x-His.

Tinh sạch protein A và protein A-3-helix

Hai protein tái tổ hợp: protein A và protein A-3-helix có đuôi his ở đầu C lần lượt được tinh chế bằng phương pháp sắc ký ái lực với cột Nickel. Protein được biểu hiện và thu ở pha tan, sau đó được lọc bằng màng lọc 0,2 μm trước khi nạp vào cột. Cột được cân bằng với dung dịch đệm (20 mM phosphate, pH 7,4), sau đó mẫu được nạp vào cột. Các protein tạp bị rửa trôi bởi dung dịch rửa (20 mM phosphate, 45 mM imidazole, pH 7,4), cuối cùng protein mục tiêu được ly giải bằng dung dịch ly giải (20 mM phosphate, 60 mM of imidazole). Sản phẩm tinh sạch được kiểm tra bằng phương pháp SDS-PAGE và nhuộm bạc. Độ tinh sạch của protein mục tiêu được kiểm tra bằng phần mềm Gel Analyzer.

Thử nghiệm tính bám trên màng nitrocellulose của protein A và protein A-3-helix

Để đánh giá độ mạnh sự hấp phụ của các protein trước các dung dịch, thử nghiệm dòng chảy bên được tiến hành. Trong phương pháp này, màng nitrocellulose được cắt ra thành những mảnh nhỏ có kích thước giống nhau. Protein mục tiêu (nồng độ mol là 10^{-6} M) được nhỏ giọt lên màng bằng pipet với thể tích là 1 μL . Sau khi protein bám lên màng, thực hiện rửa trôi bằng các dung dịch khác nhau (H_2O , PBS, PBS-T 0,05%). Màng nitrocellulose đóng vai trò là pha tĩnh, dung dịch qua màng là pha động. Dung dịch rửa trôi di chuyển trên màng theo chiều bắt đầu từ đầu thấm với chất lỏng. Trên quãng đường di chuyển, dung dịch được cho đi qua vùng màng có protein. Nếu protein không bám chặt vào màng bị lực mao dẫn của dung dịch cuốn trôi, hệ quả là protein bị loang ra, còn protein bám màng tốt thì không cho thấy hiện tượng này, hoặc loang rất ít. Hiện tượng này có thể được ghi nhận bằng phương pháp nhuộm với thuốc nhuộm Ponceau S. Sau khi rửa trôi, quan sát hình dạng và tín hiệu đậm nhạt của chấm protein trên màng⁸. Thử nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần.

Thử nghiệm cố định kháng thể

Thử nghiệm dựa trên Western blot nhằm kiểm tra tính bám định hướng của protein trên màng thông qua tín hiệu trung gian là kháng thể. Dựa vào khả năng bắt kháng thể của protein A, A-3-helix. Các hỗn hợp bao gồm: kháng thể IgG, protein A và IgG, protein A-3-helix và IgG được cố định lên màng. Lượng kháng thể được cố định trên màng, sau khi tác dụng lực rửa trôi, được phát hiện thông qua kháng thể anti-IgG và dung dịch hiện màu TMB. Thử nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần.

Thử nghiệm khả năng bắt kháng thể

Thử nghiệm này dựa vào khả năng bắt vào đuôi Fc của kháng thể, và nguyên tắc của phương pháp dòng chảy. Protein mục tiêu được phun lên màng nitrocellulose bằng máy phun kháng thể (ClaremonBio, Mỹ), sau đó được thử nghiệm dòng chảy với dung dịch chứa kháng thể đã được đánh dấu hạt vàng. Tín hiệu được phát hiện dựa trên màu của hạt vàng gắn kháng thể (DCN, Mỹ). Thử nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần.

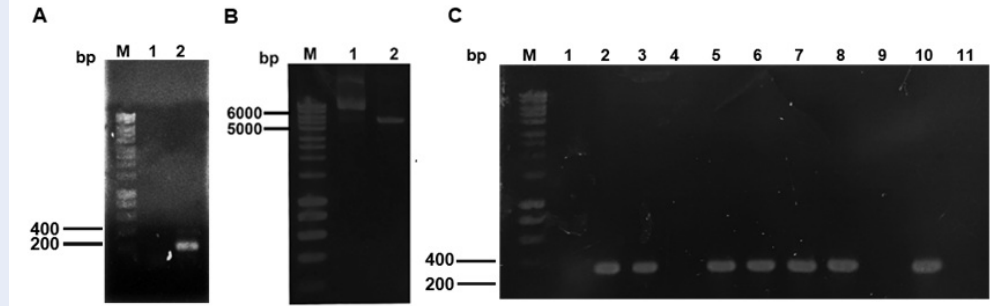
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Dòng hóa plasmid pET22b-proA

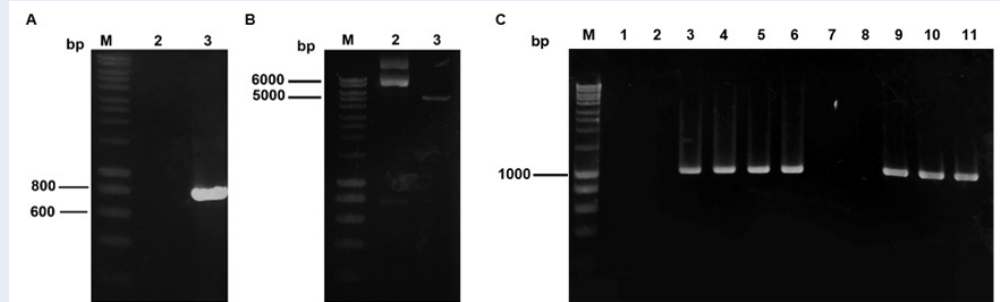
Gene *proA* được thiết kế có chiều dài 173 bp, được thu nhận bằng phương pháp PCR. Kết quả điện di DNA cho thấy gene *proA* ở gần vạch 200 bp (Hình 1A, giếng 2) phù hợp với kích thước dự đoán. Mẫu chứng âm không hiện vạch, chứng tỏ phản ứng PCR không bị ngoại nhiễm (Hình 1A, giếng 1), từ đó, có thể dự đoán đã thu được thành công gene *proA*. Gene mục tiêu sau đó được xử lý với hai enzyme cắt hạn chế *Bam*HI và *Nde*I và được nối với plasmid pET22b đã được xử lý với hai enzyme cắt hạn chế tương ứng (Hình 1B, giếng 2). Kết quả sàng lọc dòng mang gene *proA* cho thấy có 7 trên 10 khuẩn lạc cho vạch sản phẩm hiện diện ở vị trí gần vạch 400 bp, phù hợp với dự đoán là 330 bp (Hình 1C, giếng 2,3,5,6,7,8,10). Mẫu Chứng âm không hiện vạch, chứng tỏ phản ứng PCR không bị ngoại nhiễm (Hình 1C, giếng 1). Kết quả này cho thấy đã chèn thành công gene *proA* vào plasmid pET22b.

Dòng hóa plasmid pET22b-proA-3-helix

Gene *3-helix* được thiết kế có chiều dài 723 bp. Tiến hành thu gene *3-helix* bằng phương pháp PCR. Kết quả điện di DNA cho thấy gene *3-helix* có vị trí ở giữa vạch 600 bp và 800 bp (Hình 2A, giếng 2). Đối chứng âm không hiện vạch chứng tỏ phản ứng PCR không bị ngoại nhiễm (Hình 2A, giếng 1), từ đó, có thể dự đoán đã thu được thành công gene *3-helix*. Gene *3-helix* và plasmid pET22b-*proA* sau khi xử lý với enzyme cắt giới hạn (Hình 2B, giếng 2) được nối với nhau bằng *T4 ligase*. Kết quả sàng lọc dòng mang gene *3-helix* cho thấy có 7 trên 10 khuẩn lạc cho vạch sản phẩm ở vị trí gần vạch 1000 bp, phù hợp với dự đoán (Hình 2C, giếng 3,4,5,6,9,10,11). Đối chứng âm không hiện vạch, chứng tỏ phản ứng PCR không bị ngoại nhiễm (Hình 2C, giếng 1), vậy đã chèn thành công gene *3-helix* vào plasmid pET22b-*proA*.



Hình 1: (A) Thu nhận gene *proA*: M, Thang DNA 1kb; 1, đối chứng âm; 2, gene *proA*. (B) Thu nhận và cắt pET22b: M. Thang DNA 1kb; 1. Plasmid pET22b; 2. Plasmid pET22b/*NdeI*+*Bam*HI. (C) Kiểm tra dòng hóa gene *proA* bằng PCR khuẩn lạc với cặp môi trên gene và môi trên plasmid: M, Thang DNA 1kb; 1, Đối chứng âm; 2-11, Các khuẩn lạc dự tuyển



Hình 2: (A) Thu nhận gene *3-helix*: M, Thang DNA 1kb; 1, Đối chứng âm; 2, gene *3-helix*. (B) Thu nhận và cắt pET22b-*proA*: M. Thang DNA 1kb; 1. Plasmid pET22b-*proA* 2. Plasmid pET22b-*proA*/*Hind*III+*Xho*I. (C) Kiểm tra dòng hóa gene *3-helix* bằng PCR khuẩn lạc với cặp môi trên gene và môi trên plasmid: M, Thang DNA 1kb; 1, Đối chứng âm; 2-11, Các khuẩn lạc dự tuyển

Biểu hiện protein A và protein A-3-helix

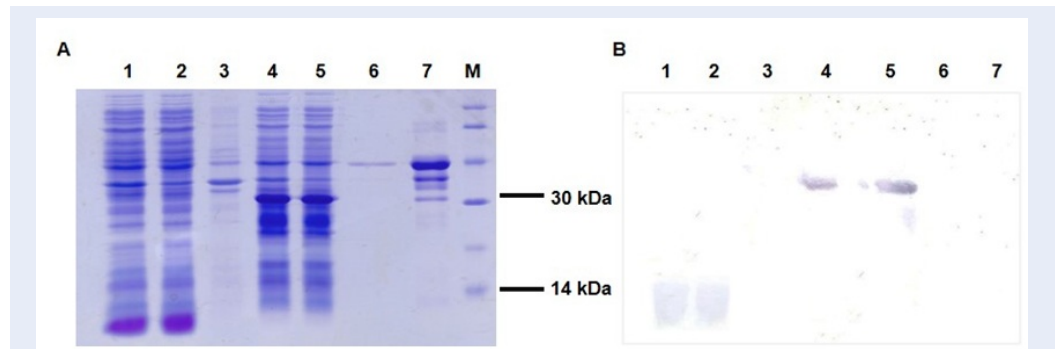
Kết quả SDS-PAGE (Hình 3A) cho thấy *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*proA* có biểu hiện một vạch protein, ở vị trí gần vạch 14 kDa (Hình 3A, giếng 1,2), *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*proA*-*3-helix* có biểu hiện một vạch protein có vị trí ở vạch 30 kDa (Hình 3A, giếng 4,5), trong khi chủng chứng âm *E. coli* BL21(DE3)/pET22b (Hình 3A, giếng 7) không biểu hiện vạch tương tự, nên dự đoán đây chính là vạch protein A và A-3-helix. Quan sát vạch protein, thấy được protein A và A-3-helix biểu hiện nhiều hơn ở pha tan.

Để xác định sự hiện diện của protein A, A-3-helix, thí nghiệm lai Western với kháng thể kháng 6xHis đã được thực hiện. Do các protein A, A-3-helix được thiết kế có đuôi dung hợp 6xHis ở đầu C nên sự biểu hiện của các protein có thể được kiểm tra bằng kháng thể kháng Histidine. Kết quả lai Western (Hình 3B) cho thấy xuất hiện các vạch đặc trưng của protein A (Hình 3B, giếng 1-3), A-3-helix

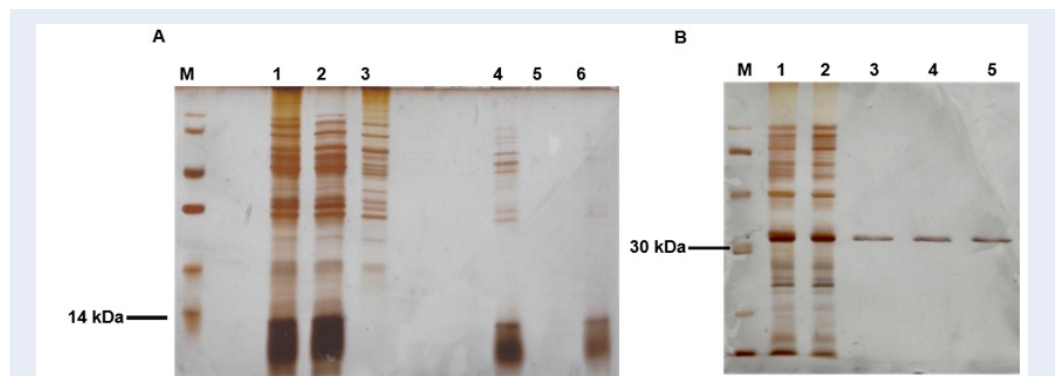
(Hình 3B, giếng 4-6) có kích thước phù hợp với kích thước dự đoán như đã phân tích ở hình nhuộm Coomassie. Vì vậy, các protein biểu hiện vượt mức ở chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*proA* và chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*proA*-*3-helix* có thể là protein A và A-3-helix.

Tinh sạch protein A và protein A-3-helix

Kết quả cho thấy trong quá trình tinh sạch protein A, vạch protein mục tiêu hiện diện ở vị trí gần vạch 14 kDa, hiện diện ở dung dịch protein nạp cột (Hình 4A, giếng 1) nhưng hiện diện ít ở dung dịch protein qua cột (Hình 4A, giếng 2), cho thấy protein mục tiêu đã bám vào cột tốt. Ở dung dịch rửa cột (Hình 4A, giếng 3) có vạch protein mục tiêu, như vậy ở bước rửa cột với nồng độ 45 mM imidazole đã rửa trôi một phần nhỏ protein mục tiêu. Ở dung dịch giải ly protein (Hình 4A, giếng 4-6), có một vạch lớn protein mục tiêu và một số vạch mờ của protein tạp nhiễm, cho thấy quá trình tinh sạch đã loại bỏ phần lớn protein



Hình 3: Kiểm tra và xác nhận sự biểu hiện protein A và A-3-helix. A. SDS-PAGE; B. Lai Western. M, Thang protein 14,4 – 97,0 kDa; 7, *E. coli* BL21(DE3)/pET22b (+ITPG) pha tổng; 1-3, *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-proA: 1, pha tổng; 2, pha tan; 3, pha tủa; 4-6, *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-proA-3-helix: 4, pha tổng; 5, pha tan; 6, pha tủa



Hình 4: Phân tích các phân đoạn tinh sạch protein bằng SDS-PAGE và nhuộm bạc. A, Tinh sạch protein A; B, Tinh sạch protein A-3-helix; M, Thang protein 14,4–97,0 kDa; 1, Dung dịch protein nạp cột; 2, Dung dịch protein sau khi qua cột; 3, Dung dịch rửa cột; 4-6, Dung dịch giải ly cột

tạp và thu được protein A. Kết quả tinh sạch protein A-3-helix cũng cho thấy kết quả tương tự (Hình 4B), protein mục tiêu được tinh sạch và hiện diện ở dịch dung ly có kích thước gần 30 kDa (Hình 4B, 5-6)

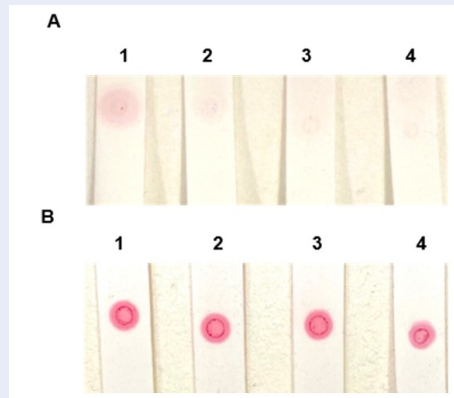
Thử nghiệm rửa trôi

Thử nghiệm nhằm đánh giá khả năng protein bám trên màng dưới tác động của dòng chảy dung dịch rửa trôi qua, protein sau khi được nhỏ lên, và mỗi màng được đặt vào đĩa có chứa dung dịch rửa trôi khác nhau trong giếng. Tín hiệu của protein sau khi rửa trôi được thể hiện bằng cách nhuộm Ponceau S. Hình 5 cho thấy protein A không bền dưới sự rửa trôi qua bởi nước (Hình 5A, màng 2) và gần như bị rửa trôi hoàn toàn trong dung dịch PBS và PBS-T 0,05% (Hình 5A, màng 3,4). Protein A khi được dung hợp với protein 3-helix cho thấy khả năng bám tốt hơn trên màng nitrocellulose, tín hiệu protein qua các dung dịch rửa bền hơn, gần như không tạo thành vệt loang (Hình 5B), vậy

protein A-3-helix có khả năng bám lên màng nitrocellulose mạnh hơn protein A. Theo nghiên cứu đã công bố, protein 3-helix có khả năng bám màng tốt⁸, nên kết quả trên giúp dự đoán rằng protein dung hợp A-3-helix có khả năng bám định hướng, hướng vị trí protein 3-helix về phía màng.

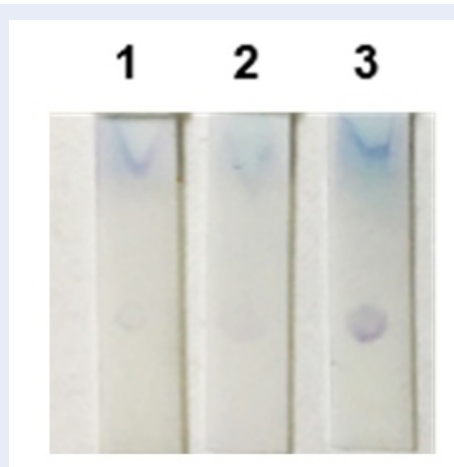
Thử nghiệm khả năng cố định kháng thể

Thử nghiệm khả năng cố định kháng thể nhằm đánh giá khả năng bám của protein A và protein A-3-helix thông qua tín hiệu trung gian là kháng thể. Hỗn hợp protein và IgG được nhỏ lên màng, sau đó được rửa trôi bởi dung dịch PBS-T có mang anti-IgG đã được đánh dấu bằng HRP. Kết quả sau khi hiện màu bằng TMB cho thấy ở màng chỉ chứa kháng thể IgG, IgG bị rửa trôi và cho tín hiệu thấp (Hình 6, màng 1) tương tự như ở màng chứa IgG + protein A (Hình 6, màng 2). Cùng một lượng kháng thể được nhỏ xuống màng nhưng tín hiệu ở màng chứa phức hợp IgG + protein A-3-helix (Hình 6, màng 3) cho tín hiệu mạnh nhất.



Hình 5: Hình dạng và kích thước của các chấm protein sau khi rửa trôi trên màng nitrocellulose. A, Protein A; B, Protein A-3-helix; 1, Không rửa trôi; 2, Rửa trôi với nước; 3, Rửa trôi với PBS; 4, Rửa trôi với PBS-T. Thử nghiệm được lặp lại 3 lần

Kết quả này tương đồng với kết quả rửa trôi trước đó. Các kết quả này bước đầu xác định được protein 3-helix hỗ trợ tăng tính bám của phức hợp protein lên màng nitrocellulose đồng thời tăng khả năng cố định kháng thể lên màng nitrocellulose so với việc nhỏ trực tiếp kháng thể lên màng nitrocellulose.

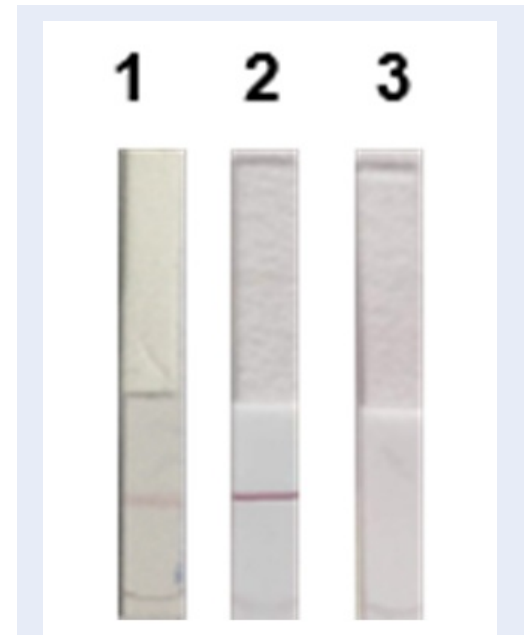


Hình 6: Tín hiệu sau thử nghiệm cố định kháng thể. 1, IgG; 2, Protein A + IgG; 3, Protein A-3-helix + IgG. Thử nghiệm được lặp lại 3 lần.

Thử nghiệm bắt kháng thể

Protein A, A-3-helix, BSA được phun lên màng sau đó được ngâm trong dung dịch chứa kháng thể đã được đánh dấu bằng hạt vàng. Kết quả quan sát cho thấy ở màng được phun BSA không xuất hiện vạch

tín hiệu (Hình 7, màng 3), trong khi ở màng A-3-helix (Hình 7, màng 2) xuất hiện vạch tín hiệu rõ nét, màng được phun protein A (Hình 7, màng 1) cũng xuất hiện vạch tuy nhiên tín hiệu không rõ nét bằng ở màng được phun protein A-3-helix. Điều này được dự đoán rằng các kháng thể được bắt giữ bởi protein A, tạo thành một đầu của protein dung hợp và đầu 3-helix của protein A-3-helix duy trì sự cố định màng nitrocellulose, do đó tăng khả năng bắt giữ kháng thể.



Hình 7: Thử nghiệm bắt kháng thể. 1, Protein A; 2, Protein A-3-helix; 3, Protein BSA. Thử nghiệm lặp lại 3 lần.

KẾT LUẬN

Với mục tiêu đánh giá khả năng bám định hướng lên màng nitrocellulose của protein dung hợp giữa protein A và protein neo màng 3-helix, chúng tôi đã thực hiện tạo protein tái tổ hợp A, A-3-helix và thử nghiệm tính bám của hai protein này lên màng nitrocellulose nhằm phục vụ cho quá trình phát triển que thử sau này. Kết quả cho thấy đã tạo được vector pET22b-proA, pET22b-proA-3-helix; biểu hiện được protein A và A-3-helix ở dạng tan trong tế bào *E. coli* BL21(DE3) khi cảm ứng IPTG ở nồng độ 0,5 mM, 25 °C, 6 giờ và tinh sạch được protein mục tiêu bằng phương pháp sắc ký ái lực ion kim loại với độ tinh sạch trên 90%. Protein A-3-helix có khả năng bám màng mạnh hơn protein A, bắt kháng thể và giúp cố định lên màng tốt hơn so với gắn trực tiếp với protein A trước tác nhân rửa trôi.

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

Amp: Ampicillin
Bp: Base pair
BSA: Bovine serum albumin
DNA: Deoxyribose nucleic acid
dNTP: Deoxynucleoside Triphosphate
His: Histidine
IgG: Immunoglobulin G
IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kDa: kilo Dalton
LB: Luria Broth
OD: Optical Density
PAGE: Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBS: Phosphate Buffer Saline
PBS-T: Phosphate Buffer Saline- Tween
PCR: Polymerase Chain Reaction
Rpm: Round per minute
SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

LỜI CẢM ƠN

Để tài nghiên cứu được tài trợ từ Chương trình KH&CN cấp quốc gia phục vụ phát triển bền vững vùng Tây Nam Bộ, mã số KHCN-TNB.ĐT/14-19/C31.

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả đồng ý không có bất kỳ xung đột lợi ích nào liên quan đến các kết quả đã công bố.

ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Trần Nguyễn Thảo Sương, Nguyễn Phước Khải Hoàn, Trần Văn Hiếu thực hiện thiết kế thí nghiệm, thu thập số liệu, xử lý kết quả và tham gia viết bài. Trần Văn Hiếu quản lý đề tài, cung cấp nguyên vật liệu và sửa chữa bài viết. Tất cả các tác giả đồng ý với bản thảo đã nộp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kafkova J. Rapid diagnostic point of care tests in resource limited settings. *International Journal of Infectious Diseases*. 2016;45:56-7; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.02.169>.
2. Gubala V, Harris LF, Ricco AJ, Tan MX, Williams DE. Point of Care Diagnostics: Status and Future. *Analytical Chemistry*. 2012;84(2):487-515; PMID: 22221172. Available from: <https://doi.org/10.1021/ac2030199>.
3. Stevens DR, Vrana CJ, Dlin RE, Korte JE. A Global Review of HIV Self-testing: Themes and Implications. *AIDS and Behavior*. 2018;22(2):497-512; PMID: 28155039. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10461-017-1707-8>.
4. Koczula KM, Gallotta A. Lateral flow assays. *Essays in Biochemistry*. 2016; 60(1):111-20; PMID: 27365041. Available from: <https://doi.org/10.1042/EBC20150012>.
5. Yang L, Biswas ME, Chen P. Study of binding between protein A and immunoglobulin G using a surface tension probe. *Biophysical Journal*. 2003;84(1):509-22; Available from: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74870-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74870-X).
6. Scott MA, Davis JM, Schwartz KA. Staphylococcal protein A binding to canine IgG and IgM. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1997;59(3):205-12; Available from: [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(97\)00073-1](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(97)00073-1).
7. Holstein CA, Chevalier A, Bennett S, Anderson CE, Keniston K, Olsen C, et al. Immobilizing affinity proteins to nitrocellulose: a toolbox for paper-based assay developers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016;408(5):1335-46; PMID: 26427504. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9052-0>.
8. Holstein CA, Bennett S, Strauch E, Chevalier A, Fu E, Baker D, et al, editors. Development of a paper-based diagnostic for influenza detection. 2014 IEEE Healthcare Innovation Conference (HIC) ; Available from: <https://doi.org/10.1109/HIC.2014.7038933>.

Generation and oriented evaluation of nitrocellulose-binding anchor protein fused protein A and its application

Thao-Suong Tran-Nguyen, Khai-Hoan Nguyen-Phuoc, Hieu Tran-Van*



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

ABSTRACT

Point-of-care testing diagnostics are current interest in research and development. Among them, Lateral Flow Test (LFT) is an on-site test strip with wide range of applications. Therefore, optimizing the sensitivity of rapid test strip is a necessary requirement. Immobilizing antibodies onto the nitrocellulose membrane is an important step to increase the sensitivity of the LFT strip for detecting pathogenic antigens. In this research, the fusion protein between nitrocellulose binding anchor protein 3-helix, a protein that has a strong affinity to nitrocellulose membrane and protein A, a protein that specifically binds to the Fc tail of IgG antibody was generated. This fusion protein was expected to help IgG antibodies strongly binding onto the nitrocellulose membrane and orientating the Fab of immobilized antibodies outwardly, thereby increasing the ability to capture the target antigen. The recombinant vector pET22b-*proA* and pET22b-*proA-3-helix* encoded for protein A and A-3-helix, respectively were subsequently cloned. Protein A and A-3-helix was induced to express using IPTG, and confirmed by SDS-PAGE and Western blot. These proteins were purified by immobilized metal affinity chromatography with the purity of more than 90%. The purified proteins were used to evaluate orientation binding on nitrocellulose membranes by the lateral flow test and antibody capture as well. Results showed that protein A-3-helix bound to nitrocellulose membrane better than that of protein A. The former proteins increased the antibody binding and stereochemical immobilizing onto nitrocellulose membrane compared to its protein A counterpart. The present results laid the foundation for the application of fusion proteins in the directed immobilization of antibodies in rapid test strips.

Key words: antibody, lateral flow test, protein A, protein 3-helix

University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

Correspondence

Hieu Tran-Van, University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

Email: tvhieu@hcmus.edu.vn

History

- Received: 10-5-2021
- Accepted: 30-10-2021
- Published: 25-12-2021

DOI : 10.32508/stdjns.v5i4.1064



Copyright

© VNU-HCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Cite this article : Tran-Nguyen T, Nguyen-Phuoc K, Tran-Van H. **Generation and oriented evaluation of nitrocellulose-binding anchor protein fused protein A and its application** . *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 5(4):1713-1720.