

TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN hG-CSF (HUMAN GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR) DUNG HỢP VỚI FERRITIN CHUỖI NẶNG CỦA NGƯỜI TRONG *E. COLI*

Nguyễn Thị Phương Hiếu, Liên Thúy Linh, Trần Linh Thuớc

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 08 tháng 01 năm 2009, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 26 tháng 05 năm 2009)

TÓM TẮT: G-CSF là một cytokine kích thích sự tăng sinh, biệt hóa, trưởng thành của bạch cầu trung tính, thường được chỉ định để điều trị bệnh giảm bạch cầu ở bệnh nhân ung thư hóa trị liệu. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả tạo dòng và biểu hiện GCSF ở dạng dung hợp với ferritin chuỗi nặng của người (FTN-H), đã được chứng minh là có tác dụng hỗ trợ khả năng gấp cuộn của một số protein người biểu hiện trong *E. coli*. Gen *hg-csf* mã hóa GCSF người và gen mã hóa FTN-H được gắn vào plasmid pET28a tạo thành vector biểu hiện pET-FHG. Đoạn 6xHis và trình tự TEV (được nhận diện và cắt chuyên biệt bởi TEV protease) được chèn vào giữa GCSF và FTN-H để hỗ trợ việc tinh chế và thu nhận GCSF sau này. pET-FHG được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21(DE3). Sự biểu hiện của FTNH-GCSF được cảm ứng bằng IPTG và đã được xác nhận bằng điện di SDS-PAGE và lai Western blot với kháng thể kháng GCSF.

Từ khóa: neutropenia, hG-CSF, *E. coli*, FTN-H, protein tái tổ hợp

1. MỞ ĐẦU

hG-CSF (human Granulocyte Colony-Stimulating Factor) là một cytokine có bản chất là glycoprotein, đóng vai trò quan trọng trong biệt hóa các tiền tế bào máu và hoạt hóa các tế bào bạch cầu hạt trung tính trưởng thành. G-CSF được sử dụng phổ biến trong điều trị bệnh giảm bạch cầu do hóa trị liệu ung thư. G-CSF trưởng thành ở người gồm 174 acid amin với khối lượng phân tử là 18,8kDa, chứa 2 cầu nối disulfide nội phân tử (Cys36-Cys42 và Cys64-Cys74) và một cystein tự do (Cys17). Dạng tự nhiên của hG-CSF được O-glycosyl hóa tại Thr133 giúp protein không bị kết tụ nhưng không ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của G-CSF [2]. Do đó, hG-CSF tái tổ hợp trong *E. coli* dù không được glycosyl hóa và có thêm một methionine ở N-terminal nhưng vẫn có hoạt tính sinh học.

GCSF thường kém bền và dễ kết tụ hay hình thành dạng dimer, polymer do protein này có tính kỵ nước cao, nhất là khi ở dạng tái tổ hợp không được glycosyl hoá trong *E. coli*. Ngoài ra, sự hiện diện của một cysteine tự do trong cấu trúc GCSF làm protein này dễ hình thành cầu nối disulfide không đúng, tạo GCSF dạng tủa dimer hay polymer. Tính toàn vẹn cấu trúc có vai trò quan trọng đối với hoạt tính sinh học của GCSF [2]. Sự phá vỡ hay hình thành sai một trong hai hay cả hai cầu nối disulfide đều cản trở sự gấp cuộn và làm giảm đáng kể hoạt tính sinh học của GCSF. Do đó hầu hết protein GCSF khi được biểu hiện trực tiếp trong *E. coli* đều hình thành thể vùi dưới dạng tủa, không tan và không có hoạt tính.

Để gia tăng tính tan của protein tái tổ hợp trong *E. coli*, một chiến lược được sử dụng là dung hợp protein mục tiêu với các protein làm gia tăng tính tan như GST, MBP... hoặc các protein có khả năng hỗ trợ gấp cuộn đúng protein [4]. Gần đây, Ahn JY và cộng sự (2005) đã phát hiện ra rằng ferritin chuỗi nặng của người (FTN-H) khi được sử dụng như một protein dung hợp có tác dụng cải thiện tính tan của một số protein người biểu hiện trong *E. coli*. Những protein dung hợp với FTN-H đều hình thành cấu trúc siêu phân tử homopolymer dạng khối cầu với đường kính 10-15 nm. Protein mục tiêu được định vị và bảo vệ bên trong khối cầu để tránh khỏi sự kết tụ không mong muốn. Ngoài ra, FTN-H lại có vai trò quan trọng trong

việc hỗ trợ các chaperone phân tử trong quá trình gấp cuộn protein. Khi tế bào rơi vào trạng thái stress như sốc nhiệt, bệnh lý..., các protein được tổng hợp dễ bị gấp cuộn sai hoặc tự kết tụ, làm mất hoạt tính sinh học. Chaperone Hsp70 DnaK tham gia vào sự gấp cuộn của các protein mới tổng hợp, ngăn cản sự kết tụ protein trong điều kiện biến tính và tái gấp cuộn protein gấp cuộn sai. Nhờ motif đặc biệt có trên FTN-H, protein dung hợp với FTN-H gia tăng ái lực với chaperone DnaK, giúp protein gấp cuộn đúng và đảm bảo có hoạt tính. [1]

Trong bài báo cáo này, chúng tôi trình bày các kết quả dòng hoá và biểu hiện hG-CSF dung hợp với FTN-H dạng tan trong tế bào chất *E. coli* nhằm mục tiêu tạo được dòng tế bào cho phép tổng hợp hG-CSF tái tổ hợp có cấu hình tự nhiên có hoạt tính, tránh được bước làm tan protein thể vùi bằng tác chất biến tính mạnh và bước tái gấp cuộn để thu được GCSF có hoạt tính.

2. NGUYÊN LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

2.1. Chúng vi sinh vật và plasmid

Escherichia coli DH5• [F- *endA1 hsdR17 (rk-/mk-) supE44 thi λ-recA1 gyrA96 Δ lacU169 (φ80 lacZ ΔM15)*] được sử dụng làm chủng chủ để tạo dòng và lưu trữ plasmid. *E. coli* BL21(DE3) [F-*dcm ompT hsdS_B (r_B-m_B-) gal met*] được sử dụng làm chủng chủ để tạo dòng và biểu hiện protein mục tiêu dưới sự cảm ứng của IPTG. Plasmid pET-*ftnh* (PTN. Công nghệ Sinh học phân tử A, trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐH quốc gia, TpHCM) có kích thước 5,8 kb, mang gen *ftnh* mã hóa cho protein FTNH, được dùng để thiết kế vector biểu hiện hG-CSF dạng dung hợp với FTNH dưới sự kiểm soát của promoter T7 khi có mặt của IPTG và có mang gen kháng kanamycin dùng để sàng lọc thể biến nạp. Đoạn 6xHis và trình tự TEV được chèn vào vị trí dung hợp để giúp thu nhận và tinh chế GCSF sau này.

2.2. Thu gen mục tiêu bằng phản ứng PCR

Phản ứng PCR được thực hiện bằng máy điều nhiệt Biorad (Biorad). Hai môi được thiết kế và tổng hợp (IDT Co. Hoa Kỳ) có mang trình tự nhận biết của enzyme cắt hạn chế *XhoI* ở đầu 5' và *HindIII* ở đầu 3' nhằm khuếch đại đoạn gen mục tiêu dài 534bp: 5'-TGAGCTCGAGCTCAGGGCTGGGCAAGGTGG-3' và 5'-TCCGAGAAGCTTGAAAACCTGTATTTTCAGG-3'. Tổng thể tích phản ứng PCR là 25ul bao gồm 1,0ul pUC57-*gcsf*, 2,0ul MgSO₄ 25mM, 2,5ul *pfu* buffer, 1,0ul dNTP 8mM, 1,0ul mỗi chuyên biệt (5ul), 2,5U *pfu* DNA polymerase (Fermentas). Chương trình phản ứng PCR bao gồm 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 1 bước biến tính ở 94°C trong 45 giây, 1 bước bắt cặp ở 56°C trong 45 giây và 1 bước kéo dài ở 72°C trong 45 giây; cuối phản ứng là 1 bước kéo dài 10 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR sau đó được bảo quản ở 4°C.

2.3. Thiết lập vector biểu hiện và tạo dòng biểu hiện hG-CSF

Sản phẩm PCR được cắt bằng cặp enzyme cắt hạn chế *XhoI* và *HindIII* (Fermentas) và tinh chế qua cột EZ-10 (Biobasic Inc.). Sản phẩm cắt được nối vào vector biểu hiện pET-*ftnh* đã được cắt mở vòng bằng cũng bằng enzyme này bằng enzyme T4 ligase (Fermentas). Vector tái tổ hợp tạo thành được đặt tên là pET-FGH và được biến nạp vào *E. coli* DH5α bằng phương pháp CaCl₂ lạnh và kiểm tra kích thước đoạn cắt trên gel agarose 1% trước khi biến nạp vào chủng biểu hiện BL21(DE3).

2.4. Sàng lọc thể biến nạp và kiểm tra bằng enzyme cắt hạn chế và PCR plasmid

Thể biến nạp DH5α pET-FGH và BL21(DE3)/pET-FGH được sàng lọc trên môi trường LB thạch có bổ sung kanamycin 40ug/ml. Thu nhận các thể biến nạp và tách plasmid bằng

phương pháp SDS kiểm. Plasmid thu nhận được kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu và phản ứng cắt với hai enzym *XhoI* và *HindIII*. Điện di sản phẩm khuếch đại và sản phẩm cắt trên gel agarose 1% và so sánh với thang DNA 1kb để kiểm tra kích thước.

2.6. Giải trình tự và phân tích

Những plasmid thu được từ các dòng tế bào tái tổ hợp sau khi được cắt bằng *XhoI* và *HindIII* cho hai vạch tương ứng với kích thước của plasmid ban đầu và gen mục tiêu sẽ được giải trình tự bằng cặp mồi T7 terminator và 3' FTH nằm trên plasmid theo phương pháp Sanger (Macrogen Co.). Trình tự thu nhận được so sánh với trình tự lý thuyết bằng phần mềm Jellyfish version 3.1.

2.7. Điều kiện nuôi cấy và biểu hiện hG-CSF

Chaperone DnaK của *E. coli* đã được biết có vai trò hỗ trợ tính tan của các protein tái tổ hợp dung hợp với FTNH người trong *E. coli* [Error! Reference source not found., 3]. Do vậy, để thu nhận được dòng tế bào *E. coli* tổng hợp hGCSF dạng tan trong tế bào chất, chúng tôi biến nạp plasmid tái tổ hợp pET-FGH cùng với plasmid biểu hiện DnaK (pDnaK) vào tế bào chủ *E. coli* BL21(DE3). Chúng *E. coli* tái tổ hợp được cảm ứng biểu hiện FTNH-hG-CSF bằng nuôi cấy lắc trong bình tam giác 1000ml chứa 250ml môi trường LB (10g/l tryptone, 5g/l cao nấm men và 5g/l muối NaCl) bổ sung kanamycin 40µg/ml, ampicillin 100µg/ml ở 37°C, tốc độ lắc 250rpm. Khi OD600 đạt 0,8, bổ sung IPTG đến nồng độ cuối là 0,5mM.

2.8. SDS-PAGE và Western blot

Các mẫu protein thu được sau khi phá tế bào bằng nhiệt sẽ được điện di trên gel polyacrylamide 12,5% có sự hiện diện của SDS và so sánh kích thước với thang protein chuẩn. Protein sau khi điện di được chuyển lên màng lai HybondTM (Amersham) và thực hiện lai Western blot với kháng thể chuột đơn dòng kháng hG-CSF (R&D, Nhật) và phát hiện nhờ kháng thể kháng IgG của chuột cộng hợp với horseradish peroxidase HRP (Abcam). Làm hiện phim bằng bộ Kit ECL (Amersham).

3. KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

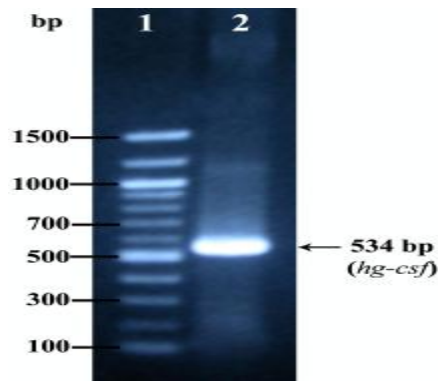
3.1. Thu nhận gen *hg-csf*

Gen *hg-csf* được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu đã cho sản phẩm PCR có kích thước khoảng 534bp (Hình 1, giếng 3) tương ứng với kích thước gen *hg-csf* lý thuyết được tham khảo trình tự từ ngân hàng gen. Như vậy cặp mồi đặc hiệu do chúng tôi thiết kế có thể dùng để thu nhận trình tự gen mục tiêu đúng như trình tự lý thuyết. Sản phẩm PCR sau đó được cắt bằng hai enzym *XhoI* và *HindIII* để chuẩn bị cho việc tạo dòng vào vector biểu hiện.

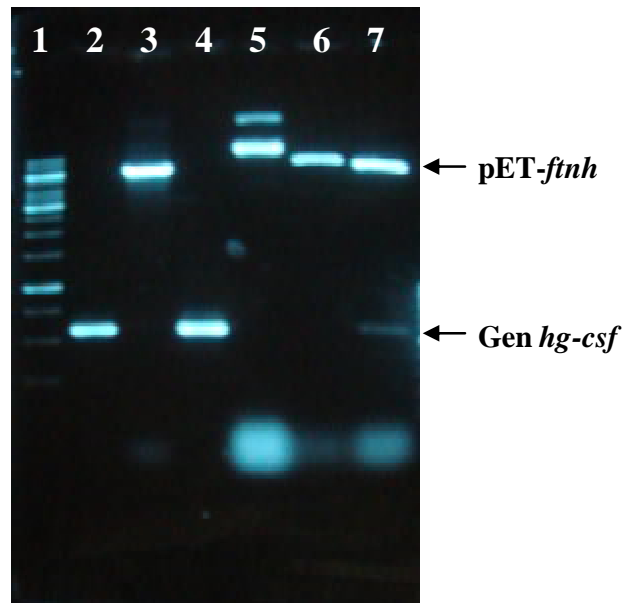
3.2. Tạo vector tái tổ hợp pET-FGH mang gen *hg-csf*

Sản phẩm khuếch đại gen *hg-csf/XhoI* và *HindIII* được tinh chế và nối vào plasmid pET-*ftnh* (chứa gen mã hóa FTNH của người) đã cắt mở vòng với cùng cặp enzyme *HindIII* và *XhoI*. Hỗn hợp sản phẩm nối được biến nạp vào *E. coli* DH5α và sàng lọc bằng môi trường LB Kan. Các plasmid nối thành công được đặt tên là pET-FGH. Kết quả điện di kiểm tra trên gel agarose 1% trên Hình 2 cho thấy: sản phẩm khuếch đại gen *hg-csf* bằng PCR là một vạch có kích thước 534bp tương ứng với kích thước gen mã hóa *hg-csf* (Giếng 2). Khi được cắt mở vòng bằng cặp enzyme *HindIII* và *XhoI* (giếng 7), plasmid tái tổ hợp pET-FGH cho một vạch có kích thước khoảng 5800bp tương ứng với plasmid pET-*ftnh* được cắt mở vòng bằng *HindIII* (giếng 3) và một vạch có kích thước 534bp tương ứng với gen *hg-csf*. Như vậy, chúng tôi đã

tạo dòng thành công vector tái tổ hợp pET-FGH chứa gen *hg-csf* dung hợp với gen *ftnh* mã hóa FTNH của người.



Hình 1. Thu nhận gen *hg-csf* bằng phản ứng PCR. 1, Thang DNA chuẩn 100 bp; 2, Sản phẩm khuếch đại gen *hg-csf* bằng cặp mồi đặc hiệu



Hình 2. Kết quả điện di trên gel agarose phân tích pET-FGH. 1, thang 1kb; 2, sản phẩm PCR thu nhận *hg-csf* từ pUC57/*hg-csf*; 3, pET-*ftnh*/*Hind*III; 4, PCR khuôn lạc; 5, pET-FGH; 6, pET-FGH/*Hind*III; 7, pET-FGH/*Xho*I và *Hind*III.

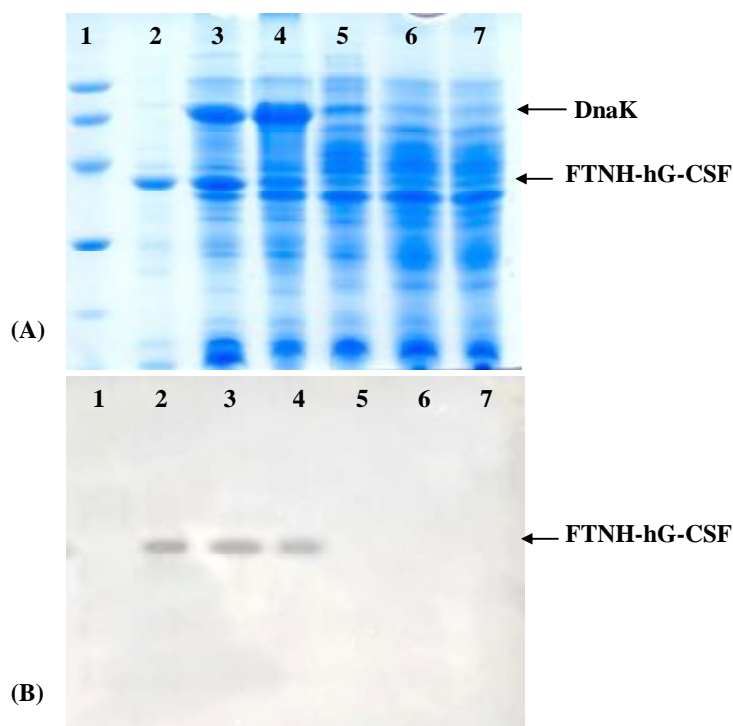
Vector tái tổ hợp này được chọn để giải trình tự bằng cặp mồi T7 terminator và 3'FTH. Việc so sánh kết quả giải trình tự với trình tự acid amin của FTNH và 6His-GCSF cho thấy *hg-csf* được nối đồng khung và có sự tương đồng 100% (**Hình 3**). Như vậy chúng tôi đã thành công trong việc thiết kế vector biểu hiện protein hG-CSF dạng dung hợp với FTNH.

	1	11	21	31	41	51	61	71
pFGf-FTH	-----							
FTH Translat	HHHHHSSGLVPRGSHMTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYDFDRDDVALKNFAKYFLHQ SHEER							
Consensus	→							
	81	91	101	111	121	131	141	151
pFGf-FTH	-----							
FTH Translat	EHAEKLMKLNQNRGGRIFLQDIKKPDCDDWESGLNAMECALHLEKNVWQSLLLELHKLATDKNDPHLCDFIETHYLNEQVK							
Consensus	← FTNH knvngslllelhklatdkndphlcdfiethylneqvk							
	161	171	181	191	201	211	221	231
pFGf-FTH	A IKELGDHVTNLRKMGAPESGLAEYLFDKHTLGDSDNESKI							
FTH Translat	A IKELGDHVTNLRKMGAPESGLAEYLFDKHTLGDSDNESKI							
Consensus	aikelgdhvtnlrkmgapesglaeylfdkhtlqgsdneski							
	TEV hGCSF →							
	81	91	101	111	121	131	141	151
pFGf-T7ter t	ENLYFQGTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQQDGAALQEKLKCATYKLCHEPELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAG							
GCSF-SP-6his	ENLYFQGTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQQDGAALQEKLKCATYKLCHEPELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAG							
Consensus	enlyfqqgtplgpasslpqsflkcleqvrkiqqdgaalqeklkcatyklchpeelvlvlgshslgipwaplsscpsqalqlag							
	161	171	181	191	201	211	221	231
pFGf-T7ter t	CLSQLHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDQVADFATTIWQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLV							
GCSF-SP-6his	CLSQLHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDQVADFATTIWQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLV							
Consensus	clsqlhsglflyqgllqalegispelegptldtlqldvadfattiwqmeelgmapalqptqgampafasafqrraggvly							
	241	251	261	271	281	291	301	311
pFGf-T7ter t	ASHLQSFLEVSRYRVLRLHAQP*ARAPPPPLRSGVTKRKRCL							
GCSF-SP-6his	ASHLQSFLEVSRYRVLRLHAQP*AR-----							
Consensus	ashlqsflevsyrvlrhlaqp ar							

Hình 3. Kết quả giải trình tự vector tái tổ hợp pET-FGH

3.3. Đồng biểu hiện protein GCSF dung hợp với FTNH và chaperone DnaK trong tế bào E. coli BL21(DE3)

Sự biểu hiện FTNH-hG-CSF của dòng *E. coli* BL21(DE3)/ pET-FGH được tiến hành bằng cách nuôi cấy và cảm ứng bằng 0,5mM IPTG, 37°C, tốc độ lắc 250rpm trong 4 giờ. Kết quả phân tích SDS-PAGE (Hình 4A) cho thấy xuất hiện một vạch protein đậm có kích thước khoảng 44kDa ở giếng 2, 3, và 4 tương ứng với các pha tủa, nổi và protein tổng số thu được từ dòng *E. coli* tái tổ hợp BL21(DE3)/ pET-FGH. Protein này hiện diện nhiều ở dịch nổi (giếng 3) hơn trong phân đoạn tủa (giếng 2). Trong khi các giếng đối chứng 5, 6, 7 đều không có sự hiện diện của protein này. Kích thước 44kDa của protein này tương ứng với protein dung hợp giữa hG-CSF với thể 6xHis và FTNH. Để khẳng định protein này là dạng dung hợp 6xHis-FTNH-TEV-hG-CSF, chúng tôi đã thực hiện lai Western blot với kháng thể kháng G-CSF và phát hiện nhờ kháng thể kháng IgG-HRP (Hình 4B). Kết quả lai cho thấy có sự xuất hiện vạch lai khoảng 44kDa ở pha tổng, tủa và nổi tương ứng với protein dung hợp 6xHis-TEV-FTNH-hG-CSF trên SDS-PAGE (giếng 2, 3, 4). Các kết quả phân tích bằng SDS-PAGE và lai Western blot cho phép kết luận rằng protein có trọng lượng phân tử khoảng 44kDa đã biểu hiện chính là protein dung hợp 6xHis-TEV-FTNH-hG-CSF. Các kết quả này cũng cho thấy 6xHis-FTNH-hG-CSF có khả năng tan trong tế bào chất *E. coli*. Với các kết quả đạt được ở trên, chúng tôi kết luận đã thu được dòng *E. coli* tái tổ hợp có khả năng biểu hiện 6xHis-FTNH-hG-CSF dạng tan trong tế bào chất.



Hình 4. Kiểm tra và xác nhận sự biểu hiện của FTNH-hG-CSF trong tế bào *E. coli* BL21(DE3)/pET-FGH bằng SDS-PAGE (A) và Western blot (B). 1, Thang phân tử lượng thấp; 2, *E. coli* BL21(DE3)/pET-FGH (+IPTG) pha tủa; 3, *E. coli* BL21(DE3)/pET-FGH (+IPTG) pha nổi; 4, *E. coli* BL21(DE3)/pET-FGH (-IPTG); 5, *E. coli* BL21(DE3)/pET-FGH (+IPTG); 6, *E. coli* BL21(DE3) (-IPTG); 7, *E. coli* BL21(DE3) (-IPTG).

Như vậy, chúng tôi đã tạo dòng thành công dòng tế bào *E. coli* BL21(DE3) có mang vector tái tổ hợp pET-FTH. Dòng này có khả năng biểu hiện vượt mức protein hG-CSF dạng dung hợp với FTNH có thể tan trong tế bào chất *E. coli*. Sự tổng hợp protein dung hợp trong dòng *E. coli* tái tổ hợp đã được kiểm chứng bằng phương pháp điện di SDS-PAGE và khẳng định lại bằng phương pháp Western blot.

CLONING AND EXPRESSING HG-CSF (HUMAN GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR) BEING FUSED WITH FERRITIN HEAVY-CHAIN IN *E. COLI*

Nguyen Thi Phuong Hieu, Lien Thuy Linh, Tran Linh Thuoc
University of Science, VNU - HCM

ABSTRACT: *G-CSF* is a cytokine that stimulates the proliferation, differentiation, function of mature neutrophils and is generally used for treatment of neutropenia in cancer patients under chemotherapy. In this study, we report results on the cloning and expression of hG-CSF being fused with the heavy-chain (FTN-H) of human ferritin, which had been showed

to be capable of facilitate the folding of several human protein expressed in *E. coli*. The *hg-csf* gene and gene encoding *FTN-H* were inserted into plasmid *pET28a* to form expression vector *pET-FHG*. *6xHis* tag and *TEV* sequence (being recognized and cleaved by *TEV* protease) was added between of *G-CSF* and *FTN-H* to facilitate *G-CSF* purification and recovery afterwards. *pET-FHG* was transformed into *E. coli* *BL21(DE3)*. The expression of *hG-CSF* was induced by *IPTG* and confirmed by *SDS-PAGE* and *Western blot* using *anti-hG-CSF* antibody.

Key words: neutropenia, *hG-CSF*, *E. coli*, *FTN-H*, recombinant protein

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1].Ahn JY, Choi H, Kim YH, Han KY, Park JS, Han SS, Lee J, *Heterologous gene expression using self-assembled supra-molecules with high affinity for hsp70 chaperone*. *Nucleic Acid Research*, 33, pp. 3751-3762, (2005).
- [2].Christopher PH, Timothy DO, David E, *The structure of granulocyte colony stimulating factor and its relationship to other growth factors*. *Biochemistry*, 90, 5167-5711, (1993).
- [3].Park SL, Shin EJ, Hong SP, Jeon SJ, Nam SW, *Production of Soluble Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor in E. coli by Molecular Chaperones*. *Microbiol. Biotechnology*, 15(6), 1267-1272, (2005).
- [4].Yamamoto A., Iwata A., Saitoh T., Tsuchiya K., Kanai T., Tsujimoto H., et al., *Expression in Escherichia coli and purification of the functional feline granulocyte colony-stimulating factor*, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 90 (3-4), pp. 169-177, (2002).