

BƯỚC ĐẦU KHẢO SÁT VÀ LÊN MEN THU NHẬN hG-CSF DẠNG THỂ VÙI KHÔNG ĐIỆN HÌNH TRONG TẾ BÀO *E. COLI* Ở QUY MÔ BÌNH LÊN MEN 1 LÍT

Nguyễn Quang Huy, Lê Minh Nhật, Vương Cát Khánh, Đặng Thị Phương Thảo, Trần Linh Thuộc

Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

hG-CSF dưới dạng protein tái tổ hợp đã và đang được ứng dụng rộng rãi trong điều trị bệnh giảm bạch cầu trung tính xuất hiện kèm theo quá trình chữa trị ung thư. hG-CSF tái tổ hợp được biểu hiện thu nhận từ nhiều hệ thống như *E. coli*, nấm men và tế bào động vật. Các công trình nghiên cứu thu nhận G-CSF từ dạng thể vùi trong *E. coli* gần đây cho thấy khả năng thu nhận một lượng lớn hG-CSF có hoạt tính bên trong thể vùi của *E. coli* trong điều kiện nuôi cấy thích hợp. Dạng thể vùi mang bên trong các tiền chất protein có cấu hình đúng được gọi là thể vùi không điện hình. Trong báo cáo này, chúng tôi bước đầu khảo sát và lên men thu nhận hG-CSF dạng thể vùi không điện hình trong tế bào *E. coli* ở quy mô bình lên men 1 L. Sự biểu hiện protein G-CSF được xác nhận bằng điện di SDS-PAGE và Western blot. Kết quả khảo sát cho thấy, thể vùi thu nhận từ quá trình lên men có khả năng hòa tan trong dung môi biến tính nhẹ, cho phép thu nhận 0,675 mg/ml protein hòa tan và giải phóng hG-CSF có hoạt tính khi được xử lý trong dung môi biến tính nhẹ (110,51 mg/g thể vùi) ở điều kiện khuấy 250 rpm là cao nhất. Các kết quả khảo sát cho thấy trên vòng sản xuất thu nhận hG-CSF dạng thể vùi không điện hình với hiệu suất cao, quy trình đơn giản khi so với việc thu nhận hG-CSF từ thể vùi điện hình theo truyền thống.

Từ khóa: hG-CSF, fermentation, non-classical inclusion bodies, recombinant protein

GIỚI THIỆU

Nhân tố kích thích biệt hóa và tăng sinh tế bào bạch cầu hạt ở người (hG-CSF) là protein tái tổ hợp được ứng dụng phổ biến trên thế giới từ cuối những năm 90 của thế kỷ trước để điều trị các bệnh liên quan đến sự suy giảm bạch cầu trong máu xuất hiện kèm theo quá trình chữa trị ung thư. Sản phẩm hG-CSF trên thị trường được sản xuất ở hai dạng hình: dạng glycosyl hóa được sản xuất trong tế bào động vật, và dạng không glycosyl hóa được sản xuất trong tế bào vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp, cả hai dạng đều có hoạt tính sinh học tương đương nhau. Trong đó, việc sản xuất trong tế bào vi khuẩn nhiều ưu việt hơn so với tế bào động vật, đó là: quy trình sản xuất, thời gian sản xuất, chi phí sản xuất thấp hơn trong khi lượng sản phẩm thu được lớn hơn. Do vậy, việc sản xuất hG-CSF ở tế bào vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp là hướng ưu tiên khi áp dụng sản xuất ở quy mô công nghiệp (Vanz *et al.*, 2008; Choi, Lee, 2004).

Hiện nay, hG-CSF được sản xuất ở tế bào vi khuẩn *E. coli* bằng công nghệ DNA tái tổ hợp nằm ở dạng thể vùi, cần phải trải qua nhiều công đoạn xử lý để có được sản phẩm hG-CSF có hoạt tính sinh học. Đó là nguyên nhân chính khiến giá thành sản phẩm rất cao. Một vài công trình nghiên cứu gần đây cho thấy khi biểu hiện G-CSF ở dạng thể vùi với điều

kiện nuôi cấy và hòa tan thích hợp có khả năng tạo ra một lượng lớn tiền chất gấp cuộn đúng có hoạt tính sinh học của hG-CSF nằm bên trong thể vùi, và có thể dễ dàng thu nhận được bằng các dung môi gây biến tính nhẹ như N-laurylsarcosine, DMSO... (Jevsevar *et al.*, 2005). Do đó, nếu thể vùi được sản xuất theo chiến lược này thì quy trình sản xuất có thể được rút ngắn đáng kể vì loại bỏ công đoạn "biến tính - hồi tính" phức tạp. Đồng thời, đây hứa hẹn cũng là một phương pháp sản xuất rất thân thiện đối với môi trường.

Trong bài báo này, Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Phân tử, Trường Đại học Khoa học tự nhiên (Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh) tiến hành bước đầu khảo sát và lên men thu nhận hG-CSF dạng thể vùi không điện hình trong tế bào *E. coli* tái tổ hợp ở quy mô bình lên men 1 l.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật, môi trường nuôi cấy, thiết bị lên men

Escherichia coli BL21(DE3)pET-gcsf mang plasmid pET-his có gen g-csf dùng để biểu hiện protein trong tế bào chất dạng thể vùi. Chủng được nuôi cấy trên môi trường Luria Bertani (LB) (10g

trypton, 5 g NaCl, và 5 g cao nấm men), nhân tổ chọn lọc là ampicillin nồng độ 100 µg/ml. Vector tái tổ hợp pET-gcsf được thiết kế và đồng hóa vào chủng *E. coli* BL21(DE3) tại phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Phân tử, Trường Đại học Khoa học tự nhiên (Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh). Nghiên cứu này sử dụng hệ thống lên men tự động BioTron-LiFlus GX GX-05-12302. Môi trường nhân giống và lên men gồm một số thành phần chính như: Glycerol, Lactose, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NH_4Cl , MgSO_4 , NaCl, Thiamine, Glucose, Yeast Extract...

Nhân giống và chuẩn bị hệ thống lên men

Các chủng được cấy từ đĩa petri vào 10 ml môi trường LB-Amp 100 µg/ml, nuôi cấy lắc ở 250 rpm, 37°C trong 12 - 14 h (khi OD_{600} đạt giá trị từ 1,2-1,5). Sử dụng 5ml giống này cấy chuyển vào 100ml môi trường cấp 2 (bổ sung Amp 100 µg/ml) để nhân giống cấp 2, nuôi cấy lắc ở 37°C, 250 rpm trong 12-14 h. Sau đó nạp giống vào bình lên men theo tỷ lệ 10%, đồng thời bổ sung Ampiciline nồng độ 100µg/ml và các thành phần cần thiết khác. Tiến hành lắp ráp bình lên men và các thiết bị như: đường ống nước giải nhiệt, động cơ khuấy, đường khí vào (air inlet), bình đựng dung dịch acid, base, antifoam vào hệ thống.

Lên men cảm ứng biểu hiện hG-CSF

Vận hành hệ thống lên men tự động với các thông số được cài đặt sẵn như sau: pH = 7,00, DO > 20%, nhiệt độ 25°C, nồng độ tác nhân gây stress isopropanol 2%, tốc độ sục khí: 1 vvm, tốc độ khuấy lần lượt là: 160, 200, 250 rpm.

Trong quá trình lên men, cách 1 h tiến hành thu dịch nuôi cấy để xác định mật độ tế bào (OD_{600}), xác định giá trị trọng lượng tế bào khô DCW nhằm khảo sát động học tăng trưởng của chủng, đồng thời dùng làm mẫu để kiểm tra và xác nhận sự biểu hiện protein bằng phương pháp SDS-PAGE và Western Blot. Sau 20 h lên men, ly tâm thu sinh khối.

Phân tích trọng lượng khô tế bào (DCW)

Tại mỗi thời điểm thu mẫu, lấy 1,5ml dịch nuôi cấy cho vào eppendorf (đã sấy khô), ly tâm bỏ dịch nổi, sau đó đem đi sấy ở 80°C trong 4 h đến khi khối lượng khô tế bào không đổi. Mẫu sau khi sấy được đem đi cân để xác định giá trị DCW.

Phá tế bào thu nhận thể vùi không điển hình bằng áp suất cao

Sinh khối thu được đem huyền phù vào dung dịch ly giải (Tris-HCl pH = 8; 50 mM, NaCl 30 mM)

theo tỷ lệ 10 ml cho 1 g sinh khối tươi. Sau đó, dịch huyền phù này được cho đi qua máy phá M-110EH-30 Microfluidizer Processor nhằm đồng nhất hóa tế bào ở điều kiện 700 Bar qua hai chu kỳ. Dịch tế bào đã đồng nhất đem đi ly tâm ở 7000 rpm, 30 phút để thu nhận thể vùi.

Hòa tan thể vùi trong N-lauroylsarcosine 0,2%

Thể vùi thu nhận từ tế bào được hòa tan trong dung dịch Tris HCl pH 8,0 40mM, chứa tác nhân gây biến tính nhẹ N-lauroyl-sarcosine 0,2% theo tỉ lệ 1:50 (khối lượng : thể tích). Huyền phù thể vùi trong dung dịch hòa tan được lắc nhẹ ở 15°C, 120 rpm, 18 - 24 h. Sau đó, ly tâm thu nhận dịch nổi và tủa ở 6000 rpm, 30 phút, 10°C. Dịch nổi và cặn ly tâm được trích một phần để kiểm tra bằng điện di. Dịch nổi được thu nhận, bảo quản ở 4°C, trích một phần dùng cho thử hoạt tính trên tế bào M-NFS60.

Kiểm tra sự biểu hiện hG-CSF bằng SDS-PAGE và Western blot

Các mẫu protein sau khi thu nhận được biến tính và chạy điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamide 15 % cùng với thang protein chuẩn nhằm kiểm tra sự biểu hiện của protein mục tiêu. Chuyển protein sau khi điện di lên màng lai nitrocellulose và lai với kháng thể chuột đơn dòng kháng hGCSF (R&D, Nhật) và phát hiện nhờ kháng thể kháng IgG của chuột dung hợp với horseradish peroxidase HRP (Abcam). Tiến hành hiện phim bằng bộ Kit ECL (Amersham).

Xác định nồng độ protein bằng phương pháp Bradford

Xây dựng đường chuẩn Bradford với albumin là chất chuẩn ở 6 nồng độ (0, 10, 20, 30, 40, 50 µg/ml) với bước sóng 595 nm. Lấy khoảng 100 µl mẫu protein mục tiêu đem đo mật độ quang ở bước sóng 595 nm, nếu giá trị OD đo được nằm ngoài đường chuẩn thì pha loãng đến nồng độ thích hợp cho đến khi giá trị OD nằm trong đường chuẩn. Ghi nhận giá trị OD và đưa vào đường chuẩn để tính nồng độ protein có trong mẫu.

Đánh giá hoạt tính sinh học của G-CSF có trong dịch hòa tan bằng phương pháp thử hoạt tính trên tế bào M-NFS60

Hoạt tính sinh học của GCSF được xác định thông qua khả năng kích thích tăng sinh dòng tế bào M-NFS60.

Dịch nổi sau hòa tan của các mẫu thể vùi điển

hình và không điển hình được lọc qua màng cellulose 0,22 µm, sau đó được mang đi thử hoạt tính sinh học

Đánh giá hiệu quả của quá trình lên men thu nhận GCSF không điển hình.

Hiệu quả của quá trình lên men thể với không điển hình được đánh giá dựa vào lượng G-CSF có hoạt tính thu được từ các điều kiện lên men khác nhau

Dựa vào kết quả thử hoạt tính tế bào, suy ra được phần trăm G-CSF có hoạt tính nằm trong mẫu thử (A%) (được tính theo Dược Điển Châu Âu, 2009) Từ đó, lượng G-CSF có hoạt tính ($m_{G-CSF \text{ hoạt tính}}$) được tính theo công thức: $m_{G-CSF \text{ hoạt tính}} (mg) = A(\%) \times m_{\text{protein trong dịch nuôi}} (mg)$.

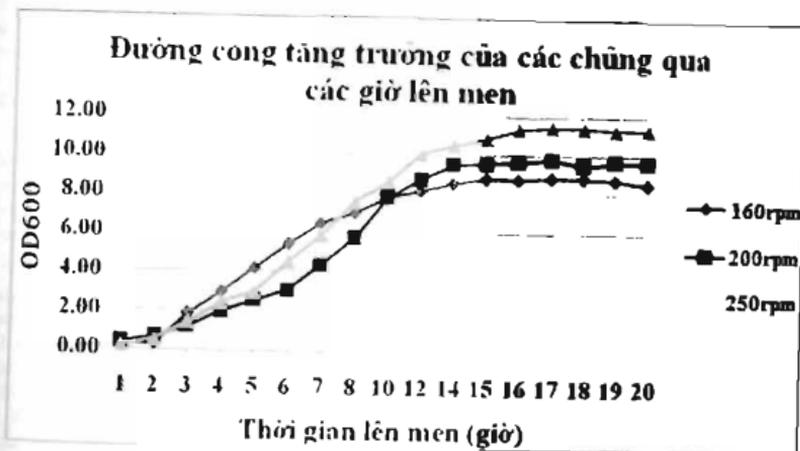
KẾT QUẢ

Khảo sát khả năng sinh tổng hợp G-CSF từ tế bào *E. coli* bằng phương pháp lên men ở các điều kiện khuấy trộn khác nhau

Động học tăng trưởng của chủng lên men được

xây dựng dựa trên mật độ tế bào (giá trị OD ở bước sóng 600 nm). Kết quả cho thấy trong 3 h nuôi cấy ban đầu, cả 3 điều kiện khuấy trộn chủng đều tăng trưởng chậm, đây là giai đoạn lag, tế bào mới thích nghi với môi trường lên men. Sau pha này các chủng tăng trưởng nhanh và mạnh, bước vào pha log, mật độ tế bào tăng cao, giai đoạn này kéo dài đến khoảng sau 14 h nuôi cấy, giá trị OD cao nhất ở 250 rpm là 11,44, 160 rpm là 8,81, và 200 rpm là 9,83. Sau đó các chủng tăng trưởng chậm dần và đi vào trạng thái ổn định, giá trị OD dao động ít, đây cũng là giai đoạn tổng hợp protein mục tiêu, giai đoạn này kéo dài đến 20 h nuôi cấy. Dựa vào đường cong của 3 chủng cho thấy các chủng tăng trưởng bình thường, quá trình lên men không bị nhiễm.

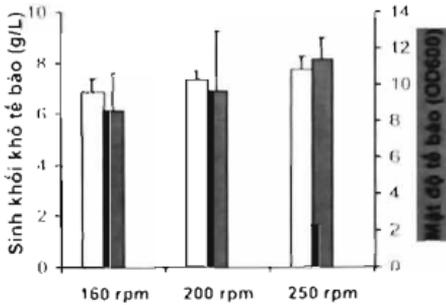
Sau 20 h lên men, tiến hành xác định trọng lượng khô tế bào và mật độ tế bào đạt được, kết quả được ghi nhận trong bảng 1. Số liệu cho thấy ở 250rpm chủng đạt được mật độ cao nhất, cũng tương ứng với lượng sinh khối tế bào lớn nhất. Để xác nhận sự biểu hiện GCSF chúng tôi tiến hành điện di SDS-PAGE và lai Western. Kết quả được biểu thị trên hình 2.



Hình 1. Động học tăng trưởng của *E. coli* tái tổ hợp biểu hiện G-CSF ở các điều kiện khuấy khác nhau.

Bảng 1. Trọng lượng khô tế bào và mật độ tế bào trung bình sau 20 h lên men ở các điều kiện khuấy trộn khác nhau.

	160 rpm	200 rpm	250 rpm
sinh khối khô (g/L)	6,86 ± 0,52	7,33 ± 0,37	7,72 ± 0,53
OD	8,56 ± 2,03	9,64 ± 3,26	11,36 ± 1,22



Hình 2. Khả năng tăng trưởng của chúng ở các điều kiện khác nhau

Kiểm tra và xác nhận khả năng sinh tổng hợp GCSF ở các điều kiện lên men khác nhau

Các mẫu thu nhận trong quá trình lên men ở các giờ nuôi cấy được biến tính, sau đó tiến hành điện di SDS-PAGE, đồng thời cũng tiến hành lai Western với kháng thể kháng hG-CSF, phát hiện nhờ kháng thể kháng IgG gắn HRP. Ở cả 3 điều kiện đều xuất hiện vạch protein đậm với kích thước khoảng 18,8 kDa, tương ứng kích thước protein hGCSF, vạch protein này xuất hiện ở giờ thứ 5 đến giờ 20, so sánh trên bảng hiện phim cũng cho các vạch tín hiệu ở vị trí tương ứng, xác nhận vạch protein biểu hiện vượt mức là hG-CSF.

Như vậy, bước đầu chúng tôi đã biểu hiện thành công protein G-CSF trong điều kiện có bổ sung tác nhân gây stress tế bào.

Để đánh giá khả năng hòa tan và giải phóng G-CSF có hoạt tính từ các thể vùi thu nhận được. Các thể vùi thu nhận được sau quá trình lên men cảm ứng stress ở các điều kiện khuấy trộn khác nhau được hòa tan trong dung dịch có tác nhân gây biến tính nhẹ *N*-lauroylsarcosine 0,2% theo quy trình đã được thiết lập từ trước. Tiến hành xác định tổng lượng protein thu được trong dịch hòa tan bằng phương pháp Bradford và xác định phần trăm protein có hoạt tính trong dịch hòa tan thông qua thí nghiệm hoạt tính kích thích tăng sinh tế bào i. Thông qua đó, chúng tôi có thể chọn được các thể vùi tối nhất (trong các thể vùi thu được từ quá trình lên men) cho mục tiêu thu nhận G-CSF có hoạt tính (Peternel, Jevsevar, 2008).

Đánh giá khả năng hòa tan của thể vùi không điển hình G-CSF ở các điều kiện khuấy trộn khác nhau

Để đánh giá khả năng hòa tan của thể vùi, các mẫu sinh khối tế bào, thể vùi trước hòa tan, dịch nổi sau hòa tan chứa protein tan, phần cặn chứa những protein không hòa tan sau khi ly tâm được phân tích bằng điện di SDS-PAGE. Kết quả điện di như hình 4.

Kết quả xác định lượng protein được hòa tan từ 1g thể vùi thu được sau các quá trình lên men ở các điều kiện khuấy trộn khác nhau được trình bày trên bảng 2, hình 5.

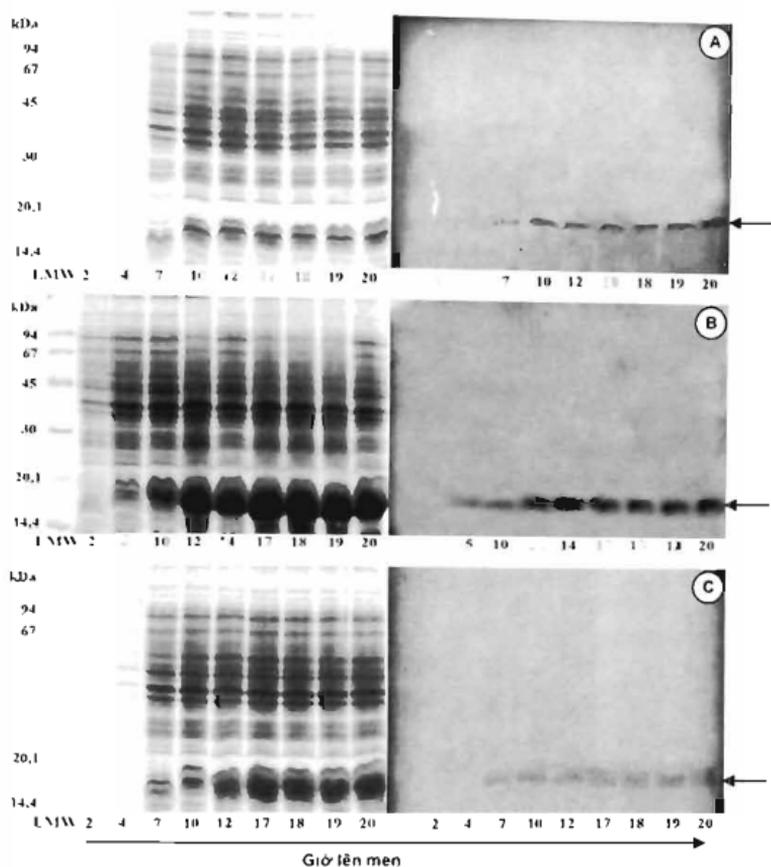
Kết quả hòa tan cho thấy, thể vùi ở các điều kiện khuấy trộn khác nhau đều có khả năng hòa tan khá cao (từ 10,18% đến 17,87%) trong *N*-lauroylsarcosine 0,2%. Phần trăm protein hòa tan, lượng protein hòa tan tính trên 1 g thể vùi và lượng protein hòa tan tính trên 1 l dịch lên men đều tăng dần theo chiều tăng của tốc độ khuấy và cao nhất ở 250 rpm, cụ thể % protein hòa tan là 17,87% và lượng protein hòa tan thu được từ mẻ lên men 1 l là 675,17. Tuy nhiên, để đánh giá và chọn loại thể vùi thích hợp cho mục tiêu thu nhận G-CSF có hoạt tính, chúng tôi tiến hành xác định % protein G-CSF có hoạt tính hiện diện trong dịch hòa tan bằng phương pháp thử hoạt tính kích thích tăng sinh tế bào *invitro*.

Kiểm tra hoạt tính sinh học của protein G-CSF trong dịch sau hòa tan

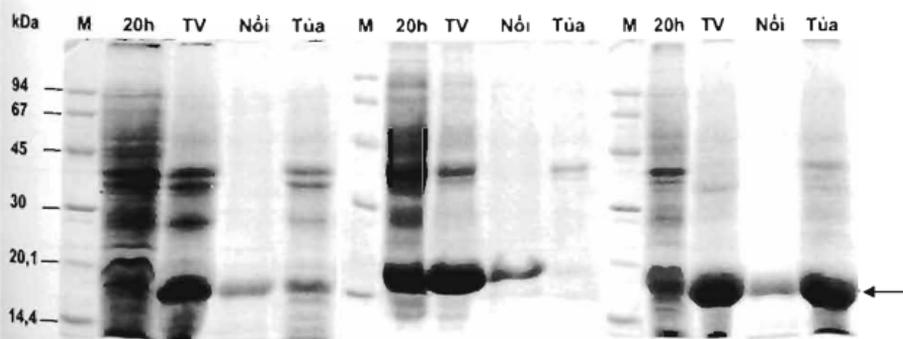
Hoạt tính sinh học của G-CSF trong dịch hòa tan thể vùi được đánh giá thông qua khả năng kích thích tăng sinh tế bào M-NFS-60. Các thí nghiệm được tiến hành song song với mẫu G-CSF chuẩn có trong thuốc neupogen.

Hoạt tính G-CSF trong mẫu thử được xác định và quy đổi dựa trên hoạt tính của G-CSF có trong neupogen. Chẳng hạn, nếu hoạt tính của G-CSF trong mẫu thử là $2,06 \times 10^7$ (IU/mg) và hoạt tính của mẫu neupogen chuẩn là $1,00 \times 10^8$ (IU/mg), thì phần trăm G-CSF có hoạt tính có trong mẫu thử là 20,61%. Kết quả thực nghiệm được trình bày trong bảng 3 và hình 6 (giá trị của mỗi điều kiện khuấy là trung bình của 3 lần lên men lặp lại). (theo Dược Điển Châu Âu, 2009).

Từ hình 6 ta thấy, ở cả 3 điều kiện lên men, protein nằm trong dịch hòa tan đều có hoạt tính sinh học. Ở điều kiện khuấy 250 rpm, phần trăm và lượng G-CSF có hoạt tính trong dịch hòa tan từ 1g thể vùi là cao nhất (tương ứng là 68,88% và 110,51 mg).



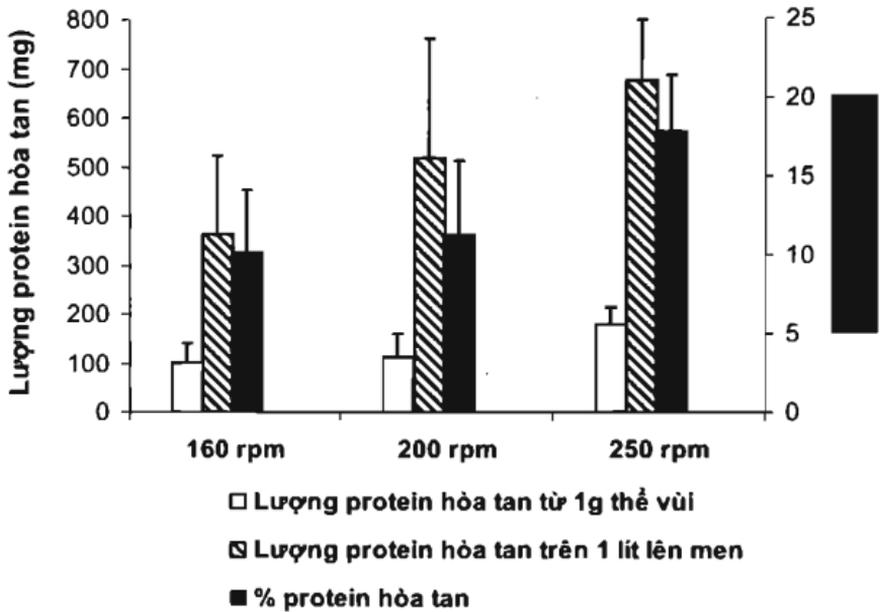
Hình 3. Sự biểu hiện protein G-CSF ở 3 điều kiện khác nhau. A: 160 rpm, B: 200 rpm, C: 250 rpm



Hình 4. Kiểm tra khả năng hòa tan của protein nằm trong thể vùi không điển hình

Bảng 2. Kết quả hòa tan thể vùi giữa các điều kiện lên men.

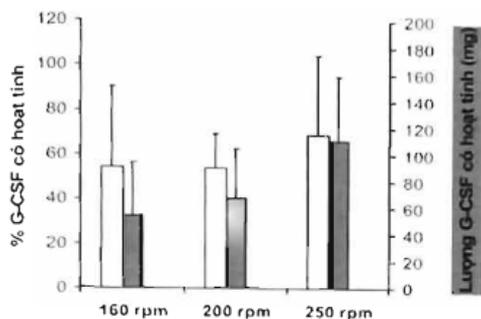
Thông số	Điều kiện		
	160 rpm	200 rpm	250 rpm
Lượng protein (mg) hòa tan trên 1g thể vùi	101,76 ± 39,97	112,86 ± 47,13	178,75 ± 35,63
% protein hòa tan	10,18% ± 4,00%	11,29% ± 4,71	17,87% ± 3,56
Tổng lượng protein hòa tan trên 1 lít lên men (mg/l)	363,95 ± 157,81	518,12 ± 242,25	675,17 ± 123,40



Hình 5. Đồ thị so sánh kết quả hòa tan protein từ thể vùi ở các điều kiện lên men.

Bảng 3. Lượng G-CSF có hoạt tính trong các dịch hòa tan thể vùi thu nhận từ các điều kiện lên men.

Thông số	Điều kiện		
	160 rpm	200 rpm	250 rpm
% G-CSF có hoạt tính	54,24% ± 36,09	54,04% ± 15,51	68,88% ± 35,75
Lượng G-CSF có hoạt tính (mg) trên 1g thể vùi hòa tan	54,31 ± 39,57	67,56 ± 36,85	110,51 ± 48,47



Hình 6. So sánh lượng G-CSF có hoạt tính trong dịch hòa tan từ thể vùi ở các điều kiện lên men

Đánh giá hiệu quả của quá trình lên men

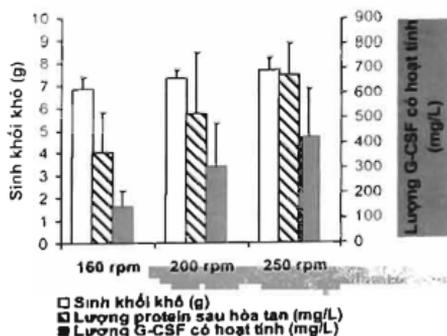
Hiệu quả lên men thu nhận G-CSF dạng thể vùi không điển hình được so sánh, đánh giá dựa trên lượng sinh khối khô thu được, lượng protein sau khi hòa tan bằng *N-lauroylsarcosine* và đặc biệt là lượng G-CSF có hoạt tính thu được sau khi hòa tan. Kết

qua so sánh được trình bày trong bảng 4 và hình 7.

Với kết quả tổng kết ở trên, chúng tôi suy ra điều kiện lên men 250 rpm cho hiệu quả cao nhất, với lượng G-CSF có hoạt tính trung bình cao nhất là 423,27 mg/L, so với ở các điều kiện 160 rpm và 200 rpm tương ứng chỉ là 149,65 mg/L và 305,63 mg/L.

Bảng 4. So sánh hiệu quả lên men ở các điều kiện khác nhau.

Thông số	Điều kiện		
	160 rpm	200 rpm	250 rpm
Sinh khối khô (g)	6.86 ± 0.52	7.33 ± 0.37	7.72 ± 0.53
Lượng protein sau hòa tan (mg/L)	363,95 ± 157,61	518,12 ± 242,25	675,17 ± 123,40
Phần trăm G-CSF có hoạt tính (A%)	54,24% ± 36,09	54,04% ± 15,51	68,88% ± 35,75
Lượng G-CSF có hoạt tính (mg/L)	149,65 ± 60,33	305,63 ± 170,78	423,27 ± 192,42



Hình 7. Đồ thị so sánh hiệu quả của các điều kiện lên men

KẾT LUẬN

Với mục đích nghiên cứu nhằm khảo sát các điều kiện lên men thu nhận G-CSF không điển hình có hoạt tính sinh học từ tế bào *E. coli* tái tổ hợp ở quy mô 1 l, góp phần cung cấp những dữ liệu đầu tiên cho mục đích xây dựng quy trình sản xuất chế phẩm hG-CSF tái tổ hợp từ thể vùi không điển hình. Chúng tôi đã thu được những kết quả như sau:

Lên men thu nhận thành công thể vùi không điển hình hG-CSF ở quy mô 1 l.

Bước đầu khảo sát điều kiện lên men thu nhận thể vùi không điển hình G-CSF đã xác định được điều kiện khuấy trộn tốt nhất là 250 rpm. Lượng protein G-CSF có hoạt tính thu được ở các điều kiện như sau: 160 rpm: 149,65 mg; 200 rpm: 305,63 mg; 250 rpm: 423,27 mg.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện bằng kinh phí của đề tài KC.04.13/06-10 (Bộ Khoa học và Công nghệ).

INITIAL INVESTIGATION AND FERMENTATIVE EXTRACTION OF NON-CLASSICAL INCLUSION BODY OF G-CSF IN *ESCHERICHIA COLI* IN 1 L-FERMANTOR

Nguyễn Quang Huy, Lê Minh Nhật, Vương Cát Khanh, Đặng Thị Phương Thảo*, Trần Linh Thuộc

University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City

SUMMARY

Recombinant human granulocyte colony stimulatory factor (rhG-CSF) has been used widely in medicine as a treatment for neutropenia which mainly caused by chemotherapy in cancer treatment. Recombinant hG-CSF is produced in many systems, such as, *E. coli*, yeasts, and mammalian cells. Recently, scientific reports have demonstrated a great possibility of producing hG-CSF with full of bioactivity from inside of *E. coli* inclusion bodies in some special conditions. The inclusion bodies which contain high level of native structure proteins inside a husk of other misfolded proteins were named as non-classical inclusion bodies. Here, we initiate investigation and fermentative extraction of non-classical inclusion body G-CSF in *Escherichia coli* in 1 L-scale. Expression of hG-CSF was confirmed by electrophoresis SDS-PAGE and Western Blot. The results showed that isolated inclusion bodies from fermentation process can be solubilized in mild detergent, resulted as 0,675 mg/ml protein solution and released 110,51mg hG-CSF which had bioactivity per 1g of inclusion bodies (highest at 250rpm stir speed). The experimental results provide a possibility of producing hG-CSF from non-classical inclusion bodies with high yield and quite simple in comparison to a process of producing hG-CSF from classical inclusion bodies.

Keywords: hG-CSF, fermentation, non-classical inclusion bodies, recombinant protein

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Choi JH, Lee SY (2004) Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 625-635.
- Jevsevar S, Gaberc-Porekar V, Fonda I, Podobnik B, Grdadolnik J, Menart V (2005) Production of Nonclassical Inclusion Bodies from Which Correctly Folded Protein Can Be Extracted. *Biotechnol Prog* 21(2): 632.
- Petermel S, Bele M, Gaberc-Porekar V, Komel R (2008) Inclusion Bodies Contraction with Implications in Biotechnology. *Acta Chim Slov* 55: 608-612.
- Petermel S, J Grdadolnik, V Gaberc-Porekar, and R Komel (2008) Engineering inclusion bodies for non denaturing extraction of functional proteins. *Microb Cell Fact* 7: 1-32.
- Petermel S, Jevsevar S, Bele M, Gaberc-Porekar V, Menart V (2008) New properties of inclusion bodies with implications for biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem* 49(P1): 239-246.
- Vanz ALS, Renard G, Palma MS, Chies JM, Dalmora SL, Basso LA, Santos DS (2008) Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization. *Microb Cell Fact* 7: 13.

* Author for correspondence: Tel: 84-8-3.8307079; E-mail: thoqdp@hcmuns.edu.vn