

THIẾT KẾ CÁC VECTOR BIỂU HIỆN MANG cDNA MÃ HÓA YẾU TỐ ĐỒNG MÁU NGƯỜI IX (F9)

Nguyễn Thùy Dương, Nguyễn Văn Phòng, Nông Văn Hải

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Yếu tố đông máu IX của người (human factor IX, F9) là một protein thuộc họ serine protease đóng vai trò rất quan trọng trong quá trình đông máu. Thiếu hụt F9 sẽ gây ra bệnh Hemophilia B. F9 đã được nghiên cứu biểu hiện ở nhiều nước trên thế giới để sản xuất được phẩm sinh học có giá trị trong điều trị các bệnh nhân Hemophilia B. Tuy nhiên, ở Việt Nam cho tới nay chưa có công bố nào về nghiên cứu sản xuất F9 tái tổ hợp. Sử dụng khuôn bản đầu pJF9 (pJET1.2 + toàn bộ trình tự cDNA mã hóa F9), hai đoạn cDNA mã hóa F9 với chuỗi polypeptide cắt đoạn tín hiệu tiết đầu N và polypeptide đầy đủ có kích thước tương ứng là 1,3 kb và 1,4 kb được khuếch đại. Các sản phẩm PCR được tạo dòng trong vector pET32a (pEF9) biểu hiện ở *Escherichia coli* và vector pcDNA3 (pcDF9) biểu hiện trong tế bào động vật có vú (CHO-S). Plasmid tái tổ hợp pEF9 và pcDF9 tương ứng sẽ biểu hiện ra các protein dung hợp với đoạn peptide Trx đầu amino và 6x histidine đầu carboxyl với kích thước lần lượt khoảng 67 và 51 kDa. Các protein lai này đã được biểu hiện thành công trong *E.coli* BL21 (DE3) và CHO-S, protein tái tổ hợp thu được từ CHO-S có kích thước phân tử và cấu trúc gần với F9 tự nhiên hơn.

Từ khóa: *Escherichia coli*, Hemophilia B, tế bào động vật nuôi cấy, thiết kế vector biểu hiện, yếu tố đông máu F9

MỞ ĐẦU

Yếu tố đông máu IX (human factor IX, F9) là một serine protease tham gia vào quá trình đông máu. Trong sự có mặt của ion Ca^{2+} , các phospholipid màng tế bào và yếu tố đông máu F8, F9 xúc tác phản ứng của con đường nội sinh hoạt hóa yếu tố F10 (tức dạng tiền chất bất hoạt) (Shen *et al.*, 2008). Yếu tố này tham gia trực tiếp vào phản ứng sản sinh thrombin, chất này xúc tác chuyển fibrinogen thành fibrin. Các tế bào hồng cầu dính vào lưới fibrin cuối cùng hình thành cục máu đông thực sự (Matters, 2001; Yepes, Lawrence, 2004).

Cấu tạo của protein F9 là một polypeptide gồm 461 amino acid với khối lượng phân tử khoảng 51 kDa. Phân tử F9 hoàn thiện được chia thành các vùng: vùng carboxylglutamic acid đầu N (N-terminal gamma-carboxylglutamic acid domain, Gla: từ gốc 1-40), vùng kỵ nước (hydrophobic stack: 41-46), 2 vùng giống nhân tố sinh trưởng biểu mô (epidermal growth factor-like domains, EGFI: 47-83, EGFI: 88-127) liên kết với nhau nhờ cầu nối linker (84-87), vùng hoạt hóa (activation peptide: 146-180) và vùng serine protease đầu C (C-terminal serine protease domain: 181-415) (Brandstetter *et al.*, 1995; Hopfner *et al.*, 1999; Schmidt, Bajaj, 2003). Vùng Gla chứa các vị trí có liên kết yếu và vừa với ion Ca^{2+} (Amphlett *et al.*, 1981; Bajaj, 1982; Li *et al.*, 1997).

trong khi đó cả hai vùng EGFI và protease đều chỉ chứa 1 vị trí liên kết mạnh với Ca^{2+} (Bajaj *et al.*, 1992; Rao *et al.*, 1995). Nhờ liên kết với ion Ca^{2+} mà cấu trúc không gian của F9 được tạo thành, do đó nó có thể thực hiện hoạt tính sinh học (Freedman *et al.*, 1995; Lenting *et al.*, 1996; Mathur *et al.*, 1997).

Vắng mặt hoặc thiếu hụt F9 sẽ gây ra bệnh Hemophilia B hay còn gọi là bệnh Christmas, một rối loạn đông máu di truyền (do gen lặn, nằm trên NST giới tính X). Người mắc bệnh Hemophilia B không bị chảy máu nhanh hơn mà bị chảy máu lâu cầm hơn bình thường. Bệnh nhân mắc bệnh này cần được điều trị thường xuyên. Nếu không được điều trị kịp thời, bệnh nhân có thể bị tử vong hoặc bị tàn tật suốt đời, tuổi thọ giảm.

Theo số liệu của Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương, hiện nay ở Việt Nam ước tính có khoảng 5000 - 7000 bệnh nhân mắc bệnh Hemophilia, gồm cả hai loại A và B, trong đó, số được phát hiện và chăm sóc tại Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương chỉ chiếm khoảng 10%. Bên cạnh đó, việc chữa bệnh đang gặp phải những khó khăn đáng kể. Điều trị bằng cách tiếp máu cũng rất tốn kém, chưa kể đến tiếp máu trực tiếp hay sử dụng F9 tủa từ máu còn mang nguy cơ tiềm ẩn lây truyền các tác nhân gây bệnh truyền nhiễm như virus viêm gan, HIV... cho bệnh nhân. Ngoài ra, người mắc

bệnh còn có thể được điều trị bằng được phẩm F9. Mặc dù protein F9 tái tổ hợp đã được nghiên cứu biểu hiện ở nhiều đối tượng: *E. coli*, BHK và CHO (Lin *et al.*, 1987; Wajih *et al.*, 2005; Dadehbeigi *et al.*, 2008), cũng như đã được nhiều công ty trên thế giới sản xuất dạng thương phẩm, như F9 (Pfizer, Mỹ) lưu hành trên thị trường với tên thương mại là BeneFIX®. Ở Việt Nam, được phẩm F9 không có sẵn trên thị trường nếu được nhập ngoại thì giá thành rất cao. Chính vì vậy, với nỗ lực bước đầu nghiên cứu quy trình sản xuất được phẩm sinh học phục vụ thương mại, chúng tôi đã thiết kế các vector biểu hiện cDNA mã hóa yếu tố đông máu F9 và biểu hiện protease rất có giá trị y được này sử dụng các hệ biểu hiện khác nhau.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

cDNA mã hóa F9 đã được chọn dòng trong vector pJET1.2 (ký hiệu pJF9). Các vector biểu hiện pET32a và pcDNA3 được mua từ Novagen và Invitrogen. Chúng *E. coli* DH5 α được sử dụng để nhân dòng. Chúng *E. coli* BL21 DE3 và tế bào động vật CHO-S được dùng để biểu hiện protein.

Các cặp mồi khuếch đại cDNA mã hóa F9 (IDT, Integrated DNA Technology) có trình tự F3: 5'-TCCAATTGAT GGATCC ACC ATG CAG CGC GTG AAC ATG-3', F4 5'-TTC TGG TGG ACC ATG GTT TTT CTT GAT CAT GAA AAC GCC-3' và R5: 5'-AT ATG CTC GAG TTA ATG GTG ATG GTG ATG GTG AGT GAG CTT TGT TTT TTC C-3', lần lượt mang các điểm cắt hạn chế *Bam*HI, *Nco*I và *Xho*I (gạch chân đơn) và 6x histidine (gạch chân kép).

Phương pháp

Đọc trình tự

cDNA mã hóa F9 trong pJF9 được đọc trình tự sử dụng mồi F3 và R5 theo phương pháp Sanger (1970).

PCR và thiết kế các plasmid chứa cDNA mã hóa F9

Các đoạn cDNA mã hóa F9 với chuỗi polypeptide cắt tín hiệu tiết đầu N và polypeptide đầy đủ từ pJF9 được khuếch đại bằng PCR với các cặp mồi F4/R5 và F3/R5 và chu trình nhiệt: 95°C/2', 30 x (95°C/30", 60°C/1', 72°C/2'), 72°C/10'. Các sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch và xử lý với hai enzyme hạn chế thích hợp rồi ghép nối vào hai vector pET32a và pcDNA3 (cùng được xử lý với

cùng hai enzyme hạn chế trên), lần lượt tạo ra các vector tái tổ hợp pEF9 và pcDF9. Sau khi biến nạp vào *E. coli* DH5 α , các plasmid tái tổ hợp được kiểm tra trên điện di trên gel agarose 0,8%, xử lý với enzyme hạn chế đồng thời xác định trình tự.

Các thao tác DNA

Các kỹ thuật phân tử dùng cho tách dòng gen: thao tác cắt, ghép nối DNA, nuôi cấy tế bào, làm tế bào khả biến, biến nạp, tách chiết DNA plasmid được thực hiện theo Sambrook và Russell (2001).

Biểu hiện protein tái tổ hợp trong tế bào *E. coli*

Các plasmid pEF9 và pET32a sau khi biến nạp vào chủng tế bào khả biến *E. coli* BL21 (DE3) được cảm ứng theo quy trình sau: Chủng *E. coli* tái tổ hợp được nuôi trong môi trường LB lỏng có bổ sung ampicillin (100 μ g/ml), lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C. Sau khi mật độ tế bào đạt OD₆₀₀ = 0,8, tiến hành cảm ứng bằng IPTG với nồng độ cuối cùng 0,5 mM. Các mẫu tế bào được thu vào các thời điểm 0, 1 và 3 h sau cảm ứng. Sự biểu hiện protein tái tổ hợp được kiểm tra bằng SDS-PAGE 12,6%.

Biểu hiện protein tái tổ hợp trong tế bào động vật CHO-S

Tế bào CHO-S được nuôi cấy trong môi trường DMEM chứa 10% huyết thanh bê, 0,1 mM hỗn hợp các amino acid không thiết yếu và 1% kháng sinh penicillin/streptomycin. Điều kiện nuôi tế bào là 37°C và 5% CO₂. Biến nạp pcDF9 và pcDNA3 vào tế bào CHO-S bằng phương pháp sử dụng Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen). Quá trình biến nạp được thực hiện như sau: Chuẩn bị đĩa tế bào với mật độ tế bào phát triển đạt từ 90 - 95%. Trước khi biến nạp 30 phút thay môi trường DMEM bằng Opti-MEM®. Pha loãng DNA plasmid (4 μ g) và Lipofectamine (10 μ l) bằng Opti-MEM® (250 μ l), để các hỗn hợp này 5 phút ở nhiệt độ phòng. Trộn đều hai hỗn hợp DNA plasmid và Lipofectamine với nhau, để 20 phút ở nhiệt độ phòng. Nhỏ nhẹ nhàng hỗn hợp chứa DNA plasmid và Lipofectamine vào đĩa tế bào CHO-S, lắc nhẹ, tiếp tục nuôi tế bào trong 6 h, sau đó thay môi trường Opti-MEM® bằng DMEM không chứa kháng sinh. Sau 2 - 3 ngày tế bào được thu lại để kiểm tra sự biểu hiện của protein tái tổ hợp.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khuếch đại cDNA mã hóa F9

Trong nghiên cứu trước, toàn bộ trình tự cDNA mã hóa F9 được tạo dòng thành plasmid pJF9 và có

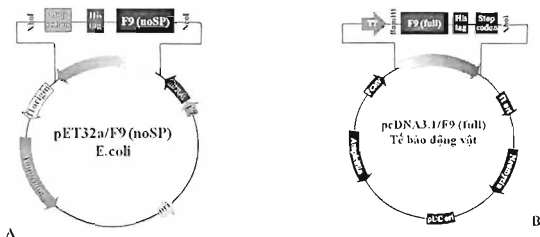
độ tương đồng 100% ở cả mức độ nucleotide và amino acid với trình tự cDNA công bố trên GenBank (NM_000133) (Nguyễn Thùy Dương *et al.*, 2010) và được đăng ký trong GenBank (FR846239). Trong nghiên cứu này, pF9 được sử dụng làm khuôn để khuếch đại hai đoạn cDNA mã hóa F9 với chuỗi polypeptide cắt tín hiệu tiết đầu N (ký hiệu F9_{noSP}) và polypeptide đầy đủ (ký hiệu F9_{full}). Sản phẩm PCR đặc hiệu có kích thước khoảng 1,3 kb và 1,4 kb, phù hợp với tính toán lý thuyết (Hình 2A, B).

Thiết kế vector mang các đoạn cDNA mã hóa F9_{noSP} và F9_{full}

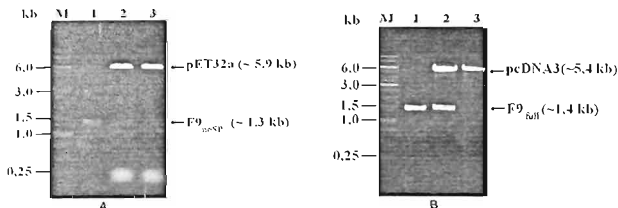
Để biểu hiện F9 trong *E. coli*, vector pET32a được sử dụng để lắp ghép đoạn cDNA mã hóa F9_{noSP} tạo thành vector tái tổ hợp pEF9. Vector pET32a có promoter T7 (cảm ứng bằng isopropyl β-D thiogalactoside, IPTG) và đoạn DNA mã hóa 158

amino acid đầu N của protein biểu hiện (bao gồm thioredoxin (Trx.Tag), His.Tag và S.Tag), giúp nhận biết và tinh chế protein biểu hiện và các vị trí cắt của enzyme thrombin và enterokinase giúp loại bỏ các peptide dung hợp. Sản phẩm PCR đã được tạo đồng trong vector pET32a ở vị trí của *Xho*I và *Nco*I (Hình 1A). Một số plasmid tái tổ hợp pEF9 thu được có kích thước lớn hơn pET32a.

Vector pcDNA3 được sử dụng để biểu hiện F9 trong tế bào động vật nuôi cấy CHO-S, có promoter CMV biểu hiện mạnh. Sau khi xử lý với *Bam*HI và *Xho*I, sản phẩm PCR được gắn vào vector pcDNA3 tại vị trí nhận biết tương ứng tạo thành vector tái tổ hợp pcDF9. Đuôi His.Tag gồm 6x histidine được thiết kế vào mỗi ngược, để tinh sạch F9 tái tổ hợp bằng sắc ký ái lực dễ dàng hơn (Hình 1B). Kết quả thu được một số plasmid tái tổ hợp pcDF9 có kích thước lớn hơn pcDNA3.



Hình 1. Bản đồ các vector biểu hiện F9. A. Vector pET32a chứa F9_{noSP} và protein dung hợp Trx. B. Vector pcDNA3 chứa F9_{full} và đuôi His Tag.



Hình 2. Sản phẩm PCR trong các plasmid tái tổ hợp. A. Plasmid tái tổ hợp F9. M: Marker 1 kb (Fermentas); 1: Sản phẩm PCR nhân cDNA mã hóa F9_{noSP}; 2: Sản phẩm cắt pEF9; 3: Sản phẩm cắt pET32a; B. Plasmid tái tổ hợp F9. M: Marker 1 kb (Fermentas); 1: Sản phẩm PCR nhân cDNA mã hóa F9_{full}; 2: Sản phẩm cắt pcDF9; 3: Sản phẩm cắt pcDNA3.

NM_000133 ATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCACCAGGCGCTCATCACCATCTGCCTTTTA 60
 pcDF9 M Q R V N M I M : E S P G L I T I C L L
 NM_000133 GGAATCTACTCAGTGTCTGAATGTACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAAT 120
 pEF9 G Y L N L S A E C T V F L D H E N A N K I
 NM_000133 CTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAAGTAAATTTGGAAGAGTTTGTTCAAGGGAACTT 180
 L N R P K R Y N S G K L E E F V Q G N L
 NM_000133 GAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTGAAGAAGCAGGAGAAGTTTGTGAAAAC 240
 E R E C M E E K C S F E E A R N V F E N
 NM_000133 ACTGAAAGAACAACCTGAATTTTGAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAAT 300
 T E R T T E F W K Q Y V D G D Q C E S N
 NM_000133 CCATGCTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCC 360
 P C L N G G S C K D D I N S Y E C W C P
 NM_000133 TTTGGATTGGAAGGAAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGA 420
 P G F E G K N C E L D V T C N I K N G R
 NM_000133 TGCAGCAGTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTCTCTCTGTACTGAGGGA 480
 C E Q C C K N S A D N K V V C S C T E G
 NM_000133 TATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCTGTGAACAGCAGTGCCATTTCATGTGGAAGA 540
 R L A E N Q K S C E P A V P P C G R
 NM_000133 GTTCTGTTTCAACAACCTTCAAGCTCACCCTGTCTGAGACTGTTTTCTGTATGGGAC 600
 V S V S Q T S K L T R A E T V P P D V D
 NM_000133 TATGTAATTTCTACTGAAGCTGAAACCAATTTGGATAACATCACTCAAAGCACCACATCA 660
 Y V N S T E E T I L L D N I T Q S T C Q S
 NM_000133 TTTAATGACTTCACTCGGCTTGTGGTGGAGAAGATGCCAAACAGGTCAATTCCCTTGG 720
 P N D T R V V G G E D A K P G Q P P W
 NM_000133 CAGGTGTGTTTGAATGTAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAAA 780
 Q V V L N G K V D A F C G G S I V N E K
 NM_000133 TGGATTGTAACCTGCTGCCACTGTGTTGAAACTGGTGTAAAAATTACAGTTGTGCGCAGGT 840
 W I V T A H C V E T G V K I T V V A G
 NM_000133 GAACATAATATTGAGGAGACAGAACATACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTGCAATTATT 900
 E H N I E E T E H T E Q K R N V I R I I
 NM_000133 CCTCACCACAACCTACAATGCAGCTATTATAAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAA 960
 P H H N Y N A A I N K Y N H D I A L L E
 NM_000133 CTGGACGAACCTTGTGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTGTCATTGCTGACAAGGAA 1020
 L D E P L V L N S V V T P I C I A D K E
 NM_000133 TACACGAACATCTTCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTC 1080
 Y T N I P L K P G S G Y V S G W G R V F
 NM_000133 CACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTCTTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTGACCGAGCC 1140
 H K G R S L V L Q Y L R V P H V T R A
 NM_000133 ACATGCTCTTCGATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCAT 1200
 T C L R S T K T I Y N N M F C G P H
 NM_000133 GAAGGAGGTAGAGATTCTATCAAGGAGATAGTGGGGACCCCATGTACTGAAAGTGGA 1260
 E G G R R D S C Q G D S G G P H V T E V E
 NM_000133 GGGACCAAGTTTCTTAAGTGAATATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCCAA 1320
 G T S F L T G I I S W G E E C F M K G K
 NM_000133 TATGGAATATATACCAAGGTATCCCGTATGTCACTGGATTAAAGGAAAAACAAGCTC 1380
 Y G I T K V S R Y V N W I K E K T K L
 NM_000133 ACTTAA 1386
 T *

Hình 3 Trình tự nucleotide và amino acid suy diễn của các plasmid pEF9 (bắt đầu từ TVF) và pcDF9 (bắt đầu từ MQR) mang cDNA mã hóa F9_{msc} và F9_{ss} tương ứng và trình tự đã công bố NM_000133.

Các dòng plasmid pEF9 và pcDF9 được kiểm tra bằng cách xử lý với các enzyme hạn chế *XhoI/NcoI* (pEF9) và *BamHI/XhoI* (pcDF9). Kết quả xử lý

enzyme hạn chế được chạy điện di trên gel agarose 0,8% thu được các băng ~1,3 kb và ~1,4 kb đúng với lý thuyết (Hình 2A, B).

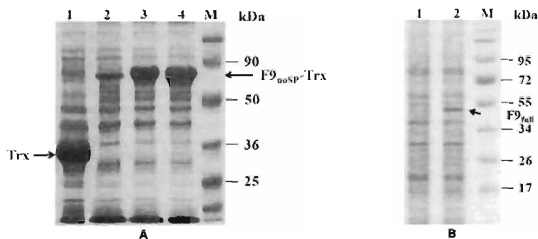
Các đoạn F9 cDNA được xác định trình tự nucleotide và so sánh với trình tự cDNA (GenBank: NM_000133), lần lượt trong 2 plasmid tái tổ hợp pEF9 và pcDF9, có kích thước 1302 bp và 1386 bp, khung dịch mã được xác định mã hóa yếu tố đông máu F9 với chuỗi polypeptide cắt đoạn peptide tín hiệu đầu N và polypeptide đầy đủ tương ứng với 433 và 461 amino acid (Hình 3). Các kết quả thu được có thể khẳng định rằng cDNA mã hóa yếu tố đông máu F9 được tạo dòng đúng trong các vector biểu hiện pET32a và pcDNA3 (ký hiệu pEF9 và pcDF9).

Biểu hiện F9 ở vi khuẩn *E. coli* và tế bào động vật CHO-S

Các chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp mang hai plasmid pET32a và pEF9 được nuôi cấy và cảm ứng bằng IPTG. Kết quả biểu hiện protein tái tổ hợp cho thấy, protein tổng số của các mẫu tế bào ở phân đoạn không tan thu tại các thời điểm khác nhau sau khi được cảm ứng bằng IPTG (các đường chạy từ 2 - 4), có xuất hiện một băng protein mới có khối lượng phân tử khoảng 67 kDa so

với mẫu đối chứng sau khi cảm ứng bởi IPTG (đường chạy 1). Như đã trình bày ở trên, ở đây sản phẩm protein F9_{noSP}-Trx biểu hiện sẽ bao gồm trình tự đoạn lại (158 aa) và trình tự F9_{noSP} (433 aa), tương đương với băng có kích thước khoảng 67 kDa. Như vậy protein mới này có trọng khối lượng phân tử phù hợp với tính toán lý thuyết về khối lượng phân tử của protein F9_{noSP}-Trx (Hình 4A).

Các tế bào CHO-S tái tổ hợp mang hai plasmid pcDNA3 và pcDF9 được thu lại sau 3 ngày chuyển gen. Dịch chiết protein tổng số của các mẫu tế bào được phân tích bằng SDS-PAGE 12,6%. Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy, trong dịch chiết protein tổng số của mẫu tế bào CHO-S mang plasmid pcDF9 (đường chạy 2) có xuất hiện băng protein mới có khối lượng phân tử khoảng 51 kDa so với mẫu tế bào mang plasmid pcDNA3 (đường chạy 1). Như vậy, hệ biểu hiện của vector pcDNA3 mang toàn bộ trình tự F9 cDNA đã hoạt động dẫn đến sự biểu hiện một loại protein mới. Protein này có khối lượng phân tử phù hợp với tính toán lý thuyết về khối lượng phân tử của protein F9 với chuỗi polypeptide đầy đủ (Hình 4B).



Hình 4. Điện di SDS-PAGE các sản phẩm protein F9 tái tổ hợp. A. Ở *E. coli*. 1: Protein tổng số của đối chứng (pET32a), sau 3 h cảm ứng bằng IPTG; 2-4: Protein tổng số của mẫu tế bào *E. coli* mang pEF9 ở pha không tan sau 0, 1 và 3 h cảm ứng. M: Marker protein; B. Ở CHO-S. 1: Đối chứng (pcDNA3); 2: Protein tổng số của tế bào CHO-S mang pcDF9; M: Marker protein.

Năm 1987, Lin và đồng tác giả đã biểu hiện F9 trong *E. coli* ở dạng cả đoạn F9 cDNA và 13 đoạn nhỏ khác nhau (Lin *et al.*, 1987). Các protein tái tổ hợp được biểu hiện dưới dạng protein dung hợp với trình tự mã hóa protein vỏ của T7 ở sau codon 326. Tất cả các protein dung hợp được biểu hiện thành công nhưng đều ở dạng thể vùi. Trong bài báo này, chúng tôi đã ứng dụng mô hình này để thiết kế vector mang F9 cDNA. Protein tái tổ hợp được thiết

kế trong vector pET32a dưới dạng dung hợp với Trx. Khác với nhóm Lin, đoạn tín hiệu tiết gồm 28 amino acid đã được cắt khỏi protein F9 tạo nên protein hoàn chỉnh. pET32a là một vector biểu hiện mạnh trong tế bào chất của *E. coli*, do đó đã tạo ra một lượng lớn F9 ở dạng thể vùi (Hình 4A), là nguồn kháng nguyên để tạo kháng thể phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo. Sử dụng pcDF9 để biểu hiện F9 trong hệ tế bào động vật có vú sẽ khắc phục được

nhược điểm protein tái tổ hợp thu được dạng thể vùi, do có quá trình biến đổi sau dịch mã thích hợp, đảm bảo hoạt tính sinh học của protein tái tổ hợp thu được (Anson *et al.*, 1985; Choo *et al.*, 1987).

Như vậy, với mục đích sử dụng cũng như ưu điểm ứng dụng khác nhau, hai plasmid tái tổ hợp mang cDNA mã hóa yếu tố đông máu F9 đã được chọn để biểu hiện F9 trong các hệ thống biểu hiện *E. coli* và tế bào động vật có vú.

KẾT LUẬN

Sản phẩm PCR của các đoạn cDNA mã hóa F9 với chuỗi polypeptide cắt tín hiệu tiết đầu N (F9_{noSP}, 1,3 kb, 433 aa) và polypeptide đầy đủ (F9_{full}, 1,4 kb, 461 aa) đã được tách dòng trong vector biểu hiện pET32a và pcDNA3, lần lượt tạo thành các plasmid pEF9 và pcDF9 và giữ nguyên trình tự như cDNA (GenBank: NM_000133).

Hai plasmid pEF9 và pcDF9 nhằm biểu hiện F9 trong *E.coli* và trong tế bào động vật có vú CHO-S đã được thiết kế thành công. Các plasmid tái tổ hợp đã được đưa vào tế bào vật chủ thích hợp, đã biểu hiện được các băng protein có kích thước phù hợp và bước đầu xác định được hoạt tính của dịch chiết protein từ tế bào động vật. Chúng tôi đang tinh sạch protein và nghiên cứu sâu hơn về các tính chất của F9 tái tổ hợp.

Lời cảm ơn: Công trình hoàn thành với kinh phí được tài trợ bởi Đề tài "Nghiên cứu tạo protein tái tổ hợp - yếu tố đông máu người trong tế bào động vật nuôi cấy" thuộc hướng Công nghệ sinh học của Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Amphlett GW, Kisiel W, Castellino FJ (1981) The interaction of Ca²⁺ with human Factor IX. *Arch Biochem Biophys* 208: 576-585.

Anson DS, Austen DEG, Brownlee GG (1985) Expression of active human clotting factor IX from recombinant DNA clones in mammalian cells. *Nature* 315: 683-685.

Bajaj SP (1982) Cooperative Ca²⁺ binding to human factor IX. Effects of Ca²⁺ on the kinetic parameters of the activation of factor IX by factor XIa. *J Biol Chem* 257: 4127-4132.

Bajaj SP, Sabharwal AK, Gorka J, Birktoft JJ (1992) Antibody-probed conformational transitions in the protease domain of human factor IX upon calcium binding and zymogen activation: putative high-affinity Ca²⁺-binding

site in the protease domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 152-156.

Brandstetter H, Bauer M, Huber R, Lollar P, Bode W (1995) X-ray structure of clotting factor IXa: Active site and module structure related to Xase activity and hemophilia B. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9796-9800.

Choo KH, Raphael K, McAdam W, Peterson MG (1987) Expression of active human blood clotting factor IX in transgenic mice: use of a cDNA with complete mRNA sequence. *Nucl Acids Res* 15: 871-883.

Dadchbeigi N, Ostad SN, Faramarzi MA, Ghahremani MH (2008) Sex hormones affect the production of recombinant Factor IX in CHO and HEK-293 cell lines. *Biotechnol Lett* 30: 1909-1912.

Freedman SJ, Furie BC, Furie B, Baleja JD (1995) Structure of the calcium ion-bound gamma-carboxyglutamic acid-rich domain of factor IX. *Biochemistry* 34: 12126-12137.

Hopfner KP, Lang A, Karcher A, Siehler K, Kopetzki E, Brandstetter H, Huber R, Bode W, Engh RA (1999) Coagulation factor IXa: the relaxed conformation of Tyr99 blocks substrate binding. *Structure* 7: 989-996.

Lenting PJ, Christophe OD, Maat H, Rees DJ, Mertens K (1996) Ca²⁺ binding to the first epidermal growth factor-like domain of human blood coagulation factor IX promotes enzyme activity and factor VIII light chain binding. *J Biol Chem* 271: 25332-25337.

Li L, Darden TA, Freedman SJ, Furie BC, Furie B, Baleja JD, Smith H, Hiskey RG, Pedersen LG (1997) Refinement of the NMR solution structure of the gamma-carboxyglutamic acid domain of coagulation factor IX using molecular dynamics simulation with initial Ca²⁺ positions determined by a genetic algorithm. *Biochemistry* 36: 2132-2138.

Lin SW, Dunn JJ, Studier FW, Stafford DW (1987) Expression of human factor IX and its subfragments in *Escherichia coli* and generation of antibodies to the subfragments. *Biochemistry* 26: 5267-5274.

Mathur A, Zhong D, Sabharwal AK, Smith KJ, Bajaj SP (1997) Interaction of factor IXa with factor VIIIa. Effects of protease domain Ca²⁺ binding site, proteolysis in the autolysis loop, phospholipid, and factor X. *J Biol Chem* 272: 23418-23426.

Matters R (2001) The production of improved tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli*. *Seminars Thromb Hemost* 27: 325-335.

Nguyễn Thùy Dương, Nguyễn Văn Phòng, Nông Văn Hải (2010) Tách dòng và phân tích trình tự cDNA mã hóa yếu tố đông máu IX (h-F9) ở người. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 8: 1785-1792.

Rao Z, Handford P, Mayhew M, Knott V, Brownlee GG,

Stuart D (1995) The structure of a Ca^{2+} -binding epidermal growth factor-like domain: its role in protein-protein interactions. *Cell* 82: 131-141.

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Schmidt AE, Bajaj SP (2003) Structure-function relationships in factor IX and factor IXa. *Trends Cardiovasc Med* 13: 39-45.

Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, Huh JW, Lee JS, Kim J, Kim YH, Stoddard BL (2008) The tertiary structure and

domain organization of coagulation factor VIII. *Blood* 111: 1240-1247.

Wajih N, Hutson SM, Owen J, Wallin R (2005) Increased production of functional recombinant human clotting factor IX by Baby Hamster kidney cells engineered to overexpress VKORC1, the vitamin K 2,3-Epoxyde-reducing Enzyme of the Vitamin K Cycle. *J Biol Chem* 280: 31603-31607.

Yepes M, Lawrence DA (2004) Tissue-type plasminogen activator and neuroserpin: a well-balanced act in the nervous system? *Trends Cardiovasc Med* 14: 173-179.

VECTOR CONSTRUCTION FOR EXPRESSION OF THE HUMAN FACTOR IX

Nguyen Thuy Duong, Nguyen Van Phong, Nong Van Hai*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Human factor IX (F9) is one of the serine proteases, playing an important role in coagulation system. A defect in factor IX can cause Hemophilia B. The protein has been well studied and expressed in many countries worldwide to produce biopharmaceutical for the treatment of Hemophilia B. However, the study of the F9 has not been carried out in Vietnam yet. The recombinant plasmid pJF9 (pJET1.2 + F9) was used as DNA template for amplification of F9 cDNA. F9 cDNA fragments of 1.3 kb and 1.4 kb were amplified by PCR and inserted into prokaryotic expression vector pET32a and mammalian expression vector pcDNA3, resulting in pEF9 and pcDF9, respectively. The recombinant expression vectors containing F9 cDNAs were identified by restriction mapping and sequence analysis. The pEF9 and pcDF9 plasmids were designed to produce fusion proteins of F9 with the Trx-Tag at the N-terminus and with a His-Tag at the C-terminus, respectively. The results showed that these proteins with molecular mass of approximately 67 and 51 kDa were expressed in BL21 (DE3) and CHO-S cells, respectively. The structure and size of the obtained protein from CHO-S is expected to be close to the biologically active factor IX.

Keywords: Construction of expression vector, blood coagulation factor IX, *Escherichia coli*, Hemophilia B, mammalian cell

* Author for correspondence: Tel./Fax: 84-4-38363222; E-mail: vhnong@ibt.ac.vn