

## TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN NHÂN TỐ PHÁT TRIỂN NGUYÊN BÀO SỢI (bFGF) NGƯỜI TRONG *ESCHERICHIA COLI*

Ngô Thị Kim Hằng<sup>1</sup>, Võ Minh Trí<sup>1,2</sup>, Hoàng Mai Phương<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Mỹ Trinh<sup>1</sup>, Trần Linh Thuộc<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Trung tâm Khoa học và Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

### TÓM TẮT

Chủng vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) biểu hiện bFGF người được tạo ra để sản xuất bFGF tái tổ hợp dùng trong nuôi cấy tế bào gốc người. Gen *fgf* mã hóa bFGF người có kích thước 512 bp được thu nhận từ plasmid pFGF bằng phương pháp cắt hạn chế sử dụng hai enzyme là *Xba*I và *Bam*HI. Sản phẩm cắt được chèn vào vector biểu hiện pET-19b tại vị trí của *Xba*I và *Bam*HI. Vector pET-19 tái tổ hợp có mang gen *fgf* đặt dưới sự kiểm soát của promoter T7 được đặt tên là pET\_FGF có khả năng biểu hiện bFGF. Plasmid pET\_FGF được kiểm tra bằng phương pháp cắt hạn chế với hai enzyme *Xba*I và *Bam*HI. Giải trình tự DNA để kiểm tra sự chính xác về trình tự và sự đồng khung dịch mã của gen *fgf* so với thiết kế. Kết quả giải trình tự cho thấy độ tương đồng đạt 100% và đồng khung dịch mã trên pET-19b. Vector này được biến nạp vào chủng *E. coli* BL21(DE3) để tạo thành chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET\_FGF. Khi nuôi cấy lắc chủng tái tổ hợp trong môi trường LB, bổ sung IPTG để cảm ứng T7 promoter, bFGF biểu hiện ở dạng thể vùi trong tế bào chết với hàm lượng chiếm khoảng 29% tổng protein sau 6 h cảm ứng khi phân tích bằng SDS-PAGE, lai Western và phản miễn xác định đậm độ Quantity-One. Sinh khối khô tế bào và sự biểu hiện bFGF cao nhất thu được tương ứng là 4 g/L và 35,7% khi lên men mẻ *E. coli* BL21(DE3)/pET\_FGF bằng hệ thống tự động Jar Fermentor quy mô 1 lít trong môi trường MLB.

**Từ khóa:** bFGF tái tổ hợp, *E. coli*, lai Western, pET-19b, SDS-PAGE, tế bào gốc

### MỞ ĐẦU

Tế bào gốc (TBG) là tế bào có khả năng tăng sinh, tự làm mới (self-renewal) thông qua cơ chế nguyên phân và biệt hóa thành những tế bào chức năng để tạo mô, cơ quan trong cơ thể hoàn chỉnh (Tuch, 2006). Trong quá trình phát triển phôi, TBG biệt hóa thành tất cả các mô phôi chuyên biệt; trong khi đó, ở cơ thể trưởng thành, TBG và tế bào tiền thân (progenitor cell) hoạt động như một hệ thống sửa chữa nhằm thay thế các tế bào chết theo chương trình hay chết trong các mô tổn thương (Alison *et al.*, 2002). TBG là nguyên liệu tiềm năng để chữa trị ung thư, bệnh tiểu đường, chấn thương cột sống, bệnh Parkinson, bệnh Alzheimer, bệnh teo cơ... (Phan Kim Ngọc *et al.*, 2009).

Để sử dụng TBG, đầu tiên số lượng cần cung cấp phải đủ lớn (Xu *et al.*, 2005a). Nhiều phương pháp và môi trường đã được sử dụng để nuôi cấy *in vitro* các loại TBG khác nhau (Loring *et al.*, 2007; Masters *et al.*, 2009). Trong quá trình nuôi cấy sản xuất, yếu cầu khắt khe về mặt chất lượng được đặt ra là TBG phải đồng nhất về mặt hình thái, duy trì khả năng tăng sinh, tự làm mới và chưa biệt hóa. Tuy

nhiên, TBG thường bị biệt hóa không mong muốn trong quá trình nuôi cấy và tạo một quần thể TBG không đồng nhất (Loring *et al.*, 2007), chính điều này đã ảnh hưởng đến hiệu quả sử dụng TBG ở các bước tiếp theo. Để khắc phục hiện tượng này, bFGF, Activin A, SCF, Flt3L EGF, LIF... được bổ sung vào môi trường trong quá trình nuôi cấy TBG. Đây là những nhân tố kích thích sự tăng sinh TBG và ngăn cản sự biệt hóa không mong muốn (Loring *et al.*, 2007; Masters *et al.*, 2009).

bFGF (basic fibroblast growth factor) hay FGF-2, là một nhân tố kích thích nguyên bào sợi nằm trong họ FGF, có vai trò trong việc điều chỉnh sự phân chia, di chuyển, biệt hóa và tồn tại của nhiều loại tế bào khác nhau như nguyên bào sợi, tế bào cơ trơn, tế bào thần kinh... Nhân tố này đã được sản xuất ở dạng tái tổ hợp trên các hệ thống *E. coli*, tế bào côn trùng, tế bào thực vật và động vật nhưng giá cả vẫn còn cao (Ding *et al.*, 2006). Trong nuôi cấy TBG người, bFGF được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp với các nhân tố kích thích tăng sinh khác trong những hệ thống môi trường phụ thuộc lớp tế bào nuôi từ chuột, cũng như hệ thống môi trường không có lớp tế bào nuôi và huyết thanh. Do có vai trò kích thích sự sinh sôi, duy

tri khả năng tự làm mới nhưng ức chế sự biệt hóa, bFGF là nhân tố thiết yếu trong quá trình tăng sinh sản xuất TBG để tạo lượng đủ lớn trước khi chủ động kích thích biệt hóa thành các mô, cơ quan khác nhau (Wang et al., 2005; Xu et al., 2005b).

Với mục đích làm giảm giá thành bFGF tạo thuận lợi cho việc nghiên cứu và ứng dụng TBG người ở Việt Nam, chúng tôi tiến hành đồng hóa gen *fgf* mã hóa bFGF người vào plasmid biểu hiện pET-19b để tạo thành plasmid tái tổ hợp pET\_FGF và biến nạp pET\_FGF vào *E. coli* BL21(DE3) tạo chủng biểu hiện cao bFGF làm nguồn nguyên liệu cung cấp cho quá trình sản xuất bFGF dùng để hỗ trợ nuôi cấy TBG người.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Chủng chủ và plasmid

Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$  [*F*-*endA1 hsdR17 (rk-mk-)* *supE44 thi X recA1 gvrA96  $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80 *lacZ*  $\Delta$ M15)] (Takara) được sử dụng để nhân bản plasmid. *E. coli* BL21(DE3) [*F*-, *ompT*, *hsdS* (*r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>*), *gal* (DE3)] được sử dụng làm tế bào chủ biểu hiện cao bFGF người tái tổ hợp.*

Plasmid pET-19b (Novagen), kích thước 5717 bp, promoter T7, cảm ứng bằng IPTG (isopropyl  $\beta$ -D thiogalactoside), gen kháng ampicillin (Amp) được dùng để tạo plasmid pET\_FGF biểu hiện bFGF.

### Tách chiết plasmid

Các plasmid được tách chiết theo phương pháp SDS-kiểm theo mô tả của Sambrook và Russell (2001).

### Thiết kế plasmid tái tổ hợp pET\_FGF mang gen *fgf*

Gen *fgf* mã hóa bFGF thu nhận từ plasmid pFGF (cung cấp bởi PTN Công nghệ Sinh học Phân tử, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên TPHCM) bằng cách cắt với enzyme cắt hạn chế *XbaI* và *BamHI* và tinh chế bằng EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction kit (BioBasic, Canada) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kích thước và nồng độ của đoạn DNA mang gen *fgf* được xác định bằng điện di trên gel agarose 1%.

Plasmid pET\_FGF được cấu trúc bằng cách nối gen *fgf* đã xử lý với *XbaI* và *BamHI* vào plasmid pET-19b cũng được xử lý với hai enzyme này. pET-19b được xử lý với *XbaI* và *BamHI*, biến tính enzyme bằng phenol/chloroform và tinh chế bằng

EZ-10 Spin Column PCR Products Purification kit (BioBasic, Canada).

### Tạo tế bào khả nạp và biến nạp plasmid pET\_FGF vào tế bào *E. coli*

Tạo tế bào *E. coli* khả nạp bằng phương pháp calcium lạnh và pET\_FGF được biến nạp vào *E. coli* DH5 $\alpha$  và *E. coli* BL21(DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt theo mô tả của Sambrook và Russell (2001). Huyền phù tế bào sau biến nạp được trải trên môi trường LB agar (tryptone 1%, yeast extract 0,5%, NaCl 0,5%, agar 2%) bổ sung Amp đạt nồng độ cuối 100  $\mu$ g/ml (LBA-Amp100), ủ 37°C, 14 - 16 h.

### Sàng lọc thể biến nạp và giải trình tự DNA

Thế biến nạp mọc thành khuẩn lạc trên LBA-Amp100 được sàng lọc để chọn dòng bằng PCR khuẩn lạc với cặp mồi T7 promoter và T7 terminator (Novagen) theo chương trình: 95°C/5 phút; 30 chu kỳ: 94°C/1 phút, 55°C/30 giây, 72°C/1 phút; kết thúc, 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Plasmid từ thể biến nạp cho kết quả dương tính ở PCR, tiếp tục được kiểm tra bằng phản ứng cắt với *XbaI* và *BamHI*.

Plasmid tái tổ hợp cho kết quả dương tính ở phản ứng cắt bằng enzyme hạn chế sẽ được giải trình ở công ty Macrogen (Hàn Quốc). Khung dịch mã được kiểm tra bằng phần mềm Jellyfish.

### Biểu hiện bFGF

*E. coli* BL21(DE3) chứa pET\_FGF [*E. coli* BL21(DE3)/pET\_FGF] được cảm ứng biểu hiện bFGF theo sự hướng dẫn của công ty Novagen. Nuôi *E. coli* BL21(DE3)/pET\_FGF bằng LB-Amp100, lắc 250 v/p, 37°C đến khi OD<sub>600</sub> đạt 0,6 - 0,8, bổ sung IPTG đến nồng độ 0,4 mM để cảm ứng sự biểu hiện bFGF, tiếp tục nuôi lắc thêm 6 h. Thu và rửa sinh khối tế bào, huyền phù tế bào trong đệm lạnh (10mM Tris-HCl, pH7, 1mM EDTA), đặt trong đá 15 phút, phá tế bào bằng Ultrasonic Cell Disruptor (Mỹ), ly tâm 13000 v/p, 4°C, 10 phút, thu phần đoạn tan (dịch nổi) và không tan (cặn). Tổng protein được chuẩn bị bằng cách thêm dung dịch nạp mẫu, đun cách thủy 5 phút, ly tâm 13000 v/p, 4°C, 15 phút, sử dụng phần dịch nổi để phân tích protein tổng.

### Phân tích SDS-PAGE và định lượng bằng Quantity-One

Sự biểu hiện bFGF được phân tích bằng SDS-PAGE 15% theo sự mô tả của Laemmli (1970). Protein được phát hiện bằng Coomassie Brilliant Blue, % biểu hiện của bFGF được xác định bằng

phẩm màng Quantity-One (BioRad), khối lượng phân tử bFGF được so với thang phân tử lượng thấp (Amersham).

### Lai Western

bFGF được phát hiện nhờ kháng thể kháng đặc hiệu bFGF (GenWay Biotech, Mỹ). Protein được chuyển lên màng nitrocellulose sau SDS-PAGE, hiện phim nhờ ECL kit (Amersham).

### Lên men mé biểu hiện bFGF bằng hệ thống Jar Fermentor BioTron-LiFlus I lit

*E. coli* BL21(DE3)/pET\_FGF được hoạt hóa trong 100 ml MLB với thành phần được phát triển từ môi trường LB trong đó có (tăng thêm lượng cao nấm men, thêm glucose, các khoáng vi lượng và một số hợp chất hữu cơ phân tử lượng nhỏ để hỗ trợ cho sự sinh trưởng của *E. coli* và biểu hiện protein tái tổ hợp, bổ sung Amp đạt nồng độ cuối 100 µg/ml, ở 37°C, 250 v/p, 18 h. Dịch hoạt hóa được cấy vào Jar Fermentor đã có sẵn 1 l MLB với tỷ lệ 15%, bổ sung Amp đạt nồng độ cuối 100 µg/ml. Cài đặt các thông số lên men pH7 (chỉnh bằng NH<sub>4</sub>OH 15% và HCl 0,5N), DO 30%, nhiệt độ 37°C, tốc độ khuấy 300 v/p, tốc độ sục khí 1vvm. Tiến hành lên men cho tới khi OD<sub>600</sub> khoảng 0,6 - 0,8, bổ sung IPTG đạt nồng độ cuối 0,5 mM để cảm ứng biểu hiện bFGF. Tiến hành thu mẫu xác định trọng lượng sinh khối khô và % biểu hiện của bFGF ở từng khoảng 2 h. Thí nghiệm lên men được thực hiện 3 lần độc lập.

## KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

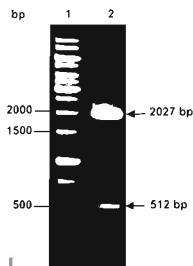
### Thiết kế plasmid tái tổ hợp pET\_FGF

Gen *fgf* (512 bp) mã hóa bFGF đã được cắt ra khỏi plasmid pFGF bằng *Xba*I và *Bam*HI (Hình 1). Gen *fgf* từ agarose gel đã được tinh chế và nối vào plasmid pET-19b cũng được xử lý bằng *Xba*I và *Bam*HI. Sản phẩm nối được biến nạp vào *E. coli* DH5α

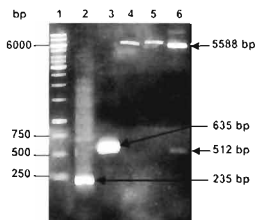
Các khuẩn lạc mọc trên LBA-Amp được sàng lọc để tuyển chọn dòng *E. coli* DH5α mang plasmid tái tổ hợp pET\_FGF mong muốn bằng PCR khuẩn lạc với cặp mồi T7 promoter/T7 terminator, cắt hạn chế và giải trình tự DNA

Khuẩn lạc cho sản phẩm PCR kích thước khoảng 635 bp (Hình 2, giếng 3), chúng tôi gen *fgf* đã được gắn vào vị trí cắt của *Xba*I và *Bam*HI trong pET-19b, trong khi đó nếu gen *fgf* không gắn sẽ cho sản phẩm PCR có kích thước khoảng 235 bp (Hình 2, giếng 2).

Khi cắt bằng hai enzyme *Xba*I và *Bam*HI, sản phẩm cắt cho 2 vạch DNA kích thước 5588 và 512 bp (Hình 2, giếng 6), hai vạch này tương ứng kích thước của pET-19b và *fgf* đã xử lý *Xba*I và *Bam*HI, trong khi đó khi xử lý *Xba*I và *Bam*HI riêng rẽ, sản phẩm cắt plasmid này cho kích thước 6100 bp (Hình 2, giếng 4, 5), đây chính là kích thước cộng gộp của pET-19b và *fgf*.



Hình 1. Sản phẩm cắt của pFGF với *Xba*I và *Bam*HI. 1, thang DNA 1kb, 2, pFGF/*Xba*I-*Bam*HI.



Hình 2. Sản phẩm PCR khuẩn lạc và sản phẩm cắt hạn chế của plasmid tái tổ hợp pET\_FGF. 1: thang DNA 1 kb; 2: sản phẩm PCR khuẩn lạc mang pET-19b; 3: sản phẩm PCR khuẩn lạc mang pET-FGF; 4: pET-FGF/*Bam*HI, 5: pET-FGF/*Xba*I, 6: pET-FGF/*Xba*I+*Bam*HI

|                  | 1                                                                                  | 11                  | 21                 | 31                   | 41    | 51                             | 61  | 71  |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------|----------------------|-------|--------------------------------|-----|-----|
| <b>pET-FGF</b>   | GGAAACATTCCTCTAGATAA                                                               | TTTGTTTAACTTTAAGAGG | AGCATATACCATGGGTAC | CATGGCTGCTGGTTCATACC |       |                                |     |     |
| <b>pFGF</b>      | -----                                                                              | -----               | -----              | -----                | ----- | ATGGGTACCATGGCTGCTGGTTCATACC   |     |     |
| <b>Consensus</b> |                                                                                    |                     |                    |                      | RBS   | atgggtaccatggctgctgggtctatcacc |     |     |
|                  | 81                                                                                 | 91                  | 101                | 111                  | 121   | 131                            | 141 | 151 |
| <b>pET-FGF</b>   | ACCTGCGCGGCTCTGCGGAAGACGGTGTCTGGTGGCTTTCCGCCGGGTACCTTAAAGACCCGAAACGTCGTACTG        |                     |                    |                      |       |                                |     |     |
| <b>pFGF</b>      | ACCTGCGCGGCTCTGCGGAAGACGGTGTCTGGTGGCTTTCCGCCGGGTACCTTAAAGACCCGAAACGTCGTACTG        |                     |                    |                      |       |                                |     |     |
| <b>Consensus</b> | acctgcgcggtctgCGGAAGACGGTGTCTGGTGGCTTTCCGCCGGGTACCTTAAAGACCCGAAACGTCGTACTG         |                     |                    |                      |       |                                |     |     |
|                  | 161                                                                                | 171                 | 181                | 191                  | 201   | 211                            | 221 | 231 |
| <b>pET-FGF</b>   | CAAAAACGGTGTTTCTCTGCGTATCCACCGGACGGTGTGTTGACGGTGTTCGTGAAAAATCTGACCCGACATCA         |                     |                    |                      |       |                                |     |     |
| <b>pFGF</b>      | CAAAAACGGTGTTTCTCTGCGTATCCACCGGACGGTGTGTTGACGGTGTTCGTGAAAAATCTGACCCGACATCA         |                     |                    |                      |       |                                |     |     |
| <b>Consensus</b> | caaaaacggtggttctctctGCGTATCCACCGGACGGTGTGTTGACGGTGTTCGTGAAAAATCTGACCCGACATCA       |                     |                    |                      |       |                                |     |     |
|                  | 241                                                                                | 251                 | 261                | 271                  | 281   | 291                            | 301 | 311 |
| <b>pET-FGF</b>   | AATGCAAGTGCAGGCTGAAGAAAGTGCGTGTGTTTCTATTAAAGTGTTTGGCGTAAACGTTACTCGGTATGAAAGAA      |                     |                    |                      |       |                                |     |     |
| <b>pFGF</b>      | AATGCAAGTGCAGGCTGAAGAAAGTGCGTGTGTTTCTATTAAAGTGTTTGGCGTAAACGTTACTCGGTATGAAAGAA      |                     |                    |                      |       |                                |     |     |
| <b>Consensus</b> | aatgcagtgCAGGCTGAAGAAAGTGCGTGTGTTTCTATTAAAGTGTTTGGCGTAAACGTTACTCGGTATGAAAGAA       |                     |                    |                      |       |                                |     |     |
|                  | 321                                                                                | 331                 | 341                | 351                  | 361   | 371                            | 381 | 391 |
| <b>pET-FGF</b>   | GACGGTGTGCTGTGGCTTCTAAATGCGTTACCGACGAATGCTTCTTCTTGGAAAGCTGTGAAATCTAAACAACTACAAAC   |                     |                    |                      |       |                                |     |     |
| <b>pFGF</b>      | GACGGTGTGCTGTGGCTTCTAAATGCGTTACCGACGAATGCTTCTTCTTGGAAAGCTGTGAAATCTAAACAACTACAAAC   |                     |                    |                      |       |                                |     |     |
| <b>Consensus</b> | gacggtgtgtCCTGTGGCTTCTAAATGCGTTACCGACGAATGCTTCTTCTTGGAAAGCTGTGAAATCTAAACAACTACAAAC |                     |                    |                      |       |                                |     |     |
|                  | 401                                                                                | 411                 | 421                | 431                  | 441   | 451                            | 461 | 471 |
| <b>pET-FGF</b>   | CTACCGTCTCTGAAATACACCTCTTGGTACGTTGCTCTGAAACGTACCGGTACGTACAAACTCTGAAACCGGTC         |                     |                    |                      |       |                                |     |     |
| <b>pFGF</b>      | CTACCGTCTCTGAAATACACCTCTTGGTACGTTGCTCTGAAACGTACCGGTACGTACAAACTCTGAAACCGGTC         |                     |                    |                      |       |                                |     |     |
| <b>Consensus</b> | ctaccgtctctGAAATACACCTCTTGGTACGTTGCTCTGAAACGTACCGGTACGTACAAACTCTGAAACCGGTC         |                     |                    |                      |       |                                |     |     |
|                  | 481                                                                                | 491                 | 501                | 511                  | 521   | Stop codon                     | 531 | 541 |
| <b>pET-FGF</b>   | CGGGTCAGAAAGCTATCTCTTCTGCGCGATGTCTGCTAAATCTTAAAGGATTCGGCTGCTAAACAAAGCCCG           |                     |                    |                      |       |                                |     |     |
| <b>pFGF</b>      | CGGGTCAGAAAGCTATCTCTTCTGCGCGATGTCTGCTAAATCTTAAAGGATTCGGCTGCTAAACAAAGCCCG           |                     |                    |                      |       |                                |     |     |
| <b>Consensus</b> | cgggtcagaaagctatctcttctGCGCGATGTCTGCTAAATCTTAAAGGATTCGGCTGCTAAACAAAGCCCG           |                     |                    |                      |       |                                |     |     |

Hình 3. Độ tương đồng và sự đồng khung dịch mã của gen *fgf* RBS, vị trí gần của nosome trong dịch mã.

Gen *fgf* trong pET\_FGF được giải trình tự và so sánh với trình tự *fgf* trong plasmid pFGF, kết quả cho thấy độ tương đồng đạt 100% và đồng khung dịch mã trên pET-19b (Hình 3).

Kết quả phân tích trên cho thấy chúng tôi đã chọn được dòng vi khuẩn *E. coli* DH5a mang plasmid tái tổ hợp mong muốn pET\_FGF, plasmid này được biến nạp vào *E. coli* BL21(DE3) để tạo chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET\_FGF biểu hiện bFGF người tái tổ hợp.

#### Biểu hiện gen *fgf* mã hóa bFGF trong *E. coli* BL21(DE3)/pET\_FGF

Nhằm đánh giá sự biểu hiện và tìm hiểu đặc tính hiện diện của bFGF ở dạng thể vùi hay hòa tan trong

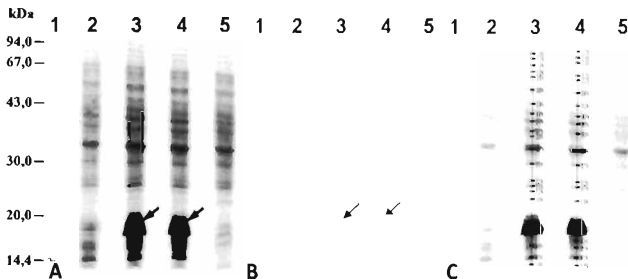
tế bào chất, chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET\_FGF được nuôi cấy lắc trong LB-Amp100 và cảm ứng bằng IPTG. Sinh khối tế bào được thu nhận sau 6 h cảm ứng, và chuẩn bị mẫu protein tổng số, phân đoạn tan (chứa bFGF tan) và phân đoạn không tan (chứa bFGF dạng thể vùi). Sự hiện diện của bFGF trong các phân đoạn tổng, phân đoạn tan và phân đoạn không tan được phân tích bằng SDS-PAGE và lai Western như mô tả ở hình 4.

Kết quả phân tích SDS-PAGE cho thấy, khi được cảm ứng bởi IPTG, chủng tái tổ hợp đã tổng hợp một lượng lớn protein có kích thước khoảng 17 kDa (Hình 4A, giếng 3), trong khi đó protein này không có trong dịch tổng khi không cảm ứng IPTG (Hình 4A, giếng 2). So sánh với khối lượng phân tử lý thuyết của bFGF khoảng 17,5 kDa, cho thấy vạch

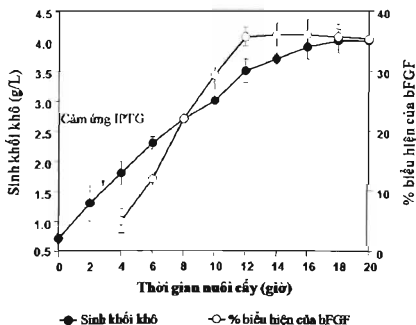
protein đậm này hiện diện trong dịch tổng được cảm ứng có thể là bFGF tái tổ hợp biểu hiện từ pET-FGF. Nhằm khẳng định vạch protein được biểu hiện là bFGF, chúng tôi phân tích thêm bằng lại Western với kháng thể đặc hiệu kháng bFGF, trên bản phim xuất hiện vạch tín hiệu tương ứng với vị trí của vạch protein xuất hiện trong dịch tổng protein khi được cảm ứng IPTG (Hình 4B, giếng 3), kết quả này khẳng định vạch protein đậm xuất hiện khi được cảm ứng chính là bFGF.

Phân tích đặc tính hiện diện của bFGF trong *E. coli* BL21(DE3)/pET\_FGF ở phân đoạn protein không tan và tan (Hình 4A, giếng 4 và 5), cho thấy bFGF biểu hiện và tồn tại ở dạng thể vùi. Định lượng bằng phần mềm Quantity-One, cho thấy bFGF biểu hiện chiếm 28,8% tổng protein của tế bào *E. coli* BL21(DE3)/pET\_FGF.

Những kết quả trên chứng tỏ chúng tôi đã thành công trong việc tạo chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET\_FGF biểu hiện vượt mức bFGF người tái tổ hợp.



Hình 4 Sự biểu hiện bFGF trong *E. coli* BL21(DE3)/pET-FGF. Điện di SDS-PAGE (A), lai Western với kháng thể đặc hiệu kháng bFGF người (B), định lượng bằng Quantity-One (C), (+)/(-), cảm ứng/không cảm ứng IPTG. 1. thang protein phân tử lượng thấp, 2. protein tổng số từ mẫu (-), 3. protein tổng số từ mẫu (+), 4. phân đoạn protein không tan (+), 5. phân đoạn tan (+). Vạch bFGF biểu hiện được định vị bởi mũi tên



Hình 5 Sinh trưởng và biểu hiện bFGF của *E. coli* BL21(DE3)/pET\_FGF trong 11 MLB ở hệ thống Jar Fermentor

## Lên men mẻ biểu hiện bFGF bằng hệ thống Jar Fermentor BioTron-LiFlus 11

Nhằm bước đầu đánh giá khả năng lên men biểu hiện bFGF của chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET\_FGF để cung cấp nguồn nguyên liệu cho quá trình sản xuất bFGF sau này, chúng tôi tiến hành lên men mẻ bằng hệ thống Jar Fermentor. Chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET\_FGF được hoạt hóa qua đêm sau đó cấy vào hệ thống lên men theo tỷ lệ 15% (v/v) đã chứa sẵn 1 lít môi trường MLB, bổ sung IPTG khi OD<sub>600</sub> đạt 0.76 (3 h sau khi cấy giống), tiếp tục lên men thêm 17 h, mẫu được lấy từ lúc cấy giống và cách nhau 2 h để phân tích sinh khối khô và % bFGF biểu hiện như mô tả ở hình 5.

Kết quả khảo sát cho thấy, sự tăng trưởng *E. coli* BL21(DE3)/pET\_FGF đạt cực đại sau 18 h nuôi cấy, tương ứng với sinh khối khô tế bào đạt 4 g/L; trong khi đó, sự biểu hiện bFGF đạt cực đại sau 9 h cảm ứng, tương ứng với % biểu hiện đạt 35.7.

## KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tạo được chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET\_FGF biểu hiện bFGF người tái tổ hợp khi cảm ứng bằng IPTG. Sự biểu hiện bFGF đã được kiểm chứng bằng phương pháp SDS-PAGE, lai Western và định lượng bằng phần mềm Quantity-One. Phân tích động học tăng trưởng *E. coli* BL21(DE3)/pET\_FGF và sự biểu hiện bFGF bằng hệ thống lên men mẻ động 1 lít cho thấy chúng có khả năng sử dụng làm giống để cung cấp nguồn nguyên liệu bFGF cho quy trình công nghệ sản xuất bFGF tái tổ hợp dùng trong nuôi cấy tế bào mầm người.

**Lời cảm ơn:** Công trình được thực hiện với sự tài trợ kinh phí, hỗ trợ về trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Đại học Quốc gia TP.HCM; Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học phân tử, và sự hỗ trợ của KTV Nguyễn Văn Nghĩa trong các thí nghiệm lên men bằng Jar Fermentor.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alison MR, Poulosom R, Forbes S, Wright NA (2002) An introduction to stem cells. *J Pathology* 197(4): 419-423.
- Ding SH, Huang LY, Wang YD, Sun HC, Xiang ZH (2006) High-level expression of basic fibroblast growth factor in transgenic soybean seeds and characterization of its biological activity. *Biotechnol Lett* 28: 869-875.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Loring JF, Wesselschmidt RL, Schwartz PH (2007) *Human Stem Cell Manual A Laboratory Guide, 1st ed* Elsevier/Academic Press, Amsterdam.
- Masters JR, Palsson BO (2009) *Human Adult Stem Cells*. Springer Science+Business Media NY
- Phan Kim Ngọc, Phạm Văn Phúc, Trương Định (2009) *Công nghệ tế bào gốc* Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Tuch BE (2006) Stem cells-a clinical update. *Aust Fam Physic* 35(9):719-721.
- Wang G, Zhang H, Zhao, Li J, Cai J, Wang P, Meng S, Feng J, Miao C, Ding M, Li D, Deng H (2005) Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochem Biophys Res Commun* 330: 934-942
- Xu C, Rosler E, Jiang J, Lebikowski JS, Gold JD, Sullivan CO, Delavan-Boorsma K, Mok M, Bronstein A, and Carpenter MK (2005a) Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium *Stem cells* 23(3): 315-323.
- Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T and Thomson JA (2005b) Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods* 2: 185-190.

## CLONING AND EXPRESSION OF HUMAN BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR (bFGF) IN *ESCHERICHIA COLI*

Ngo Thi Kim Hang<sup>1</sup>, Vo Minh Tri<sup>1,2,\*</sup>, Hoang Mai Phuong<sup>1</sup>, Nguyen Thi My Trinh<sup>1</sup>, Tran Linh Thuoc<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Science, Vietnam National University HoChiMinh City

<sup>2</sup>Center for Bioscience and Biotechnology, University of Science, Vietnam National University Hochiminh City

### SUMMARY

Bacterial strain of *E. coli* BL21(DE3) expressing human bFGF was generated to produce recombinant bFGF for human stem cell culture. The gene *fgf* encoding for human bFGF corresponding to a size of 512 bp was isolated from a previously established plasmid pFGF by restriction enzymes using *Xba*I and *Bam*HI. The digested product was inserted into the expression vector pET-19b at the same *Xba*I and *Bam*HI sites. The recombinant vector, termed pET\_FGF, contains the gene encoding for bFGF under the control of T7 promoter. The correction of cloning strategy was confirmed by digestion with *Xba*I and *Bam*HI enzyme and by sequencing to confirm the inframe cloning of *fgf* gene with the promoter of pET-19b. In consistent with the published database of *fgf* gene available on GenBank, the cloned gene showed completely homologous to those on publications. The vector pET\_FGF was transformed into *E. coli* BL21(DE3) to establish the recombinant *E. coli* BL21(DE3)/pET\_FGF strain. The recombinant strain was inoculated into LB medium and then supplemented with IPTG to induce the T7 promoter. The induction led to bFGF was over-expressed and accumulated as inclusion body in cytoplasm. The bFGF portion was about 29 percent of total protein after 6-hour induction measured and analyzed by SDS-PAGE, Western blot, and densitometry using Quantity-One software. The highest dry cell weight and expression of bFGF were reached at the levels of 4 g/L and 35.7 percent of total protein, respectively, using batch fermentation method in 1-liter jar fermentor containing MLB medium.

**Keywords:** bFGF, *E. coli*, pET-19b, recombinant, SDS-PAGE, stem cell, Western blot

---

\* Author for correspondence: Tel: 84-8-38307079; E-mail: [trivm1976@yahoo.com](mailto:trivm1976@yahoo.com)