

TẠO DÒNG, BIỂU HIỆN VÀ TÍNH CHẾ PROTEIN DUNG HỢP 10xHIS-RR-MINIPROINSULIN (10xHis-RR-MPI) TỪ *ESCHERICHIA COLI*

Lê Trần Thanh Nhật, Võ Minh Trí, Nguyễn Thị Mỹ Trinh, Trần Linh Thuột

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

TÓM TẮT

10xHis-RR-MPI được thiết kế nhằm rút ngắn quy trình tạo insulin người tái tổ hợp đúng trong điều trị bệnh đái tháo đường ở Việt Nam. Vị trí cắt của trypsin (RR) được chèn vào giữa thẻ 10xHis và MPI, nhờ đó thẻ 10xHis và đoạn mini C được cắt ra khỏi 10xHis-RR-MPI đã tái gấp cuộn trong cùng một bước dưới sự xúc tác của trypsin. Gen *10xhis-rr-mpi* được khuếch đại bằng PCR, đồng hóa vào pET-43 1a(+) để tạo plasmid pHTI biểu hiện 10xHis-RR-MPI dưới sự kiểm soát của promoter T7. Chủng *E. coli* BL21(DE3)/pHTI được tạo thành do hóa biến nạp pHTI vào *E. coli* BL21(DE3), nuôi cấy lắc trong môi trường LB, bổ sung IPTG để cảm ứng promoter T7. 10xHis-RR-MPI biểu hiện vượt mức, tồn tại ở dạng thể vùi trong tế bào chất và chiếm khoảng 14% tổng protein sau 10 h cảm ứng khi phân tích bằng SDS-PAGE, lai Western và phân mềm Quantity-One. 10xHis-RR-MPI được tinh sạch sau một bước tinh chế bằng sắc ký ái lực với cột Ni-NTA trong điều kiện biến tính. 18,9 mg 10xHis-RR-MPI đã tinh sạch thu được từ 500 ml môi trường LB bằng nuôi cấy lắc khi định lượng protein bằng phương pháp Bradford.

Từ khóa: *E. coli*, insulin tái tổ hợp, lai Western, pET-43 1a, SDS-PAGE, trypsin

MỞ ĐẦU

Insulin là hormone đóng vai trò chủ yếu trong điều trị đái tháo đường (ĐTĐ) type 1 và một số ít bệnh nhân ĐTĐ type 2. Hiện nay, insulin được phẩm bán trên thị trường chủ yếu sản xuất bằng con đường tái tổ hợp ở vi sinh vật, nhờ đó làm tăng cơ hội điều trị cho bệnh nhân nghèo và làm giảm đáng kể lượng bệnh nhân ĐTĐ trên thế giới (Ho và Gibaldi, 2003).

Để sản xuất insulin tái tổ hợp, đầu tiên mRNA mã hóa proinsulin (PI) người được chuyển sang cDNA và được chèn vào một plasmid biểu hiện trong tế bào chất của *E. coli*. PI thu nhận ở dạng thể vùi trong tế bào chất sẽ được làm tan bằng muối biến tính, cho tái gấp cuộn và hình thành các cầu nối disulfide (Berg *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1995). PI đã tái gấp cuộn sẽ được cắt bỏ đoạn C nhờ trypsin để thu nhận insulin có hoạt tính (Kemmler *et al.*, 1971).

Chang và đồng tác giả (1998) chứng minh rằng khi thay thế đoạn C (31 amino acid) của PI bằng mini C gồm 5 amino acid Tyr-Pro-Gly-Asp-Val, thì phân tử mini-proinsulin (MPI) có hiệu quả gấp cuộn tăng 20-40% so với PI. Trong MPI, trình tự mini C sẽ tạo nên cấu trúc β -turn (gập β) nằm giữa 4 amino acid liên tiếp Arg-Arg và Lys-Arg sẽ được nhận diện và phân cắt bởi trypsin. Cấu trúc β -turn được hình thành ở hai chuỗi của phiến β (β -sheet) đối song song, cần cho sự gấp cuộn protein (Zimmerman

et al., 1977). Trong trường hợp của MPI, β -turn sẽ gấp đôi cấu trúc MPI, điều này giúp cho hai đoạn B và A được tiếp xúc với nhau tốt hơn nên dễ dàng hình thành các cầu nối disulfide chính xác hơn.

Trong bài báo trước, Chu Kỳ Nam và đồng tác giả (2005) đã tạo dòng thành công gen *mpi* vào chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET43Ins, đồng thời chứng minh MPI được biểu hiện vượt mức và tồn tại ở dạng thể vùi trong tế bào chất bằng SDS-PAGE, lai Western. MPI được cấu trúc ở dạng dung hợp với thẻ tinh chế 6xHis qua trung gian methionine (6xHis-M-MPI), trong đó methionine là vị trí cắt của cyanua bromide (CNBr) giúp loại bỏ 6xHis ra khỏi MPI sau quá trình tinh chế. Từ 6xHis-M-MPI, insulin có hoạt tính được tạo ra như sau: thu nhận thể vùi 6xHis-M-MPI, hòa tan thể vùi, cắt loại bỏ 6xHis bằng CNBr, tái gấp cuộn MPI để tạo các cầu nối disulfide (S-S) đúng, xử lý MPI đã tái gấp cuộn với trypsin để loại bỏ đoạn mini C ra khỏi insulin và tinh chế thu nhận insulin.

Ở nghiên cứu này, nhằm thực hiện việc cắt loại bỏ thẻ tinh chế 10xHis và mini C trong cùng một phản ứng dưới sự xúc tác của trypsin, chúng tôi sử dụng công nghệ gen chèn vị trí cắt của trypsin gồm 2 arginine (RR) vào giữa thẻ tinh chế 10xHis và MPI tạo cấu trúc protein dung hợp 10xHis-RR-MPI. Với 10xHis-RR-MPI, insulin có hoạt tính được tạo ra theo một quy trình ngắn và tiết kiệm hơn: thu nhận

thể vùi 10xHis-RR-MPI, hòa tan thể vùi, tải gấp cuộn 10xHis-RR-MPI để tạo các cầu nối S-S đúng, xử lý 10xHis-RR-MPI đã tải gấp cuộn với trypsin để loại bỏ 10xHis và đoạn mini C ra khỏi insulin và tinh chế thu nhận insulin có hoạt tính

Với mục đích tiết kiệm chi phí và rút ngắn quy trình tạo insulin người tải tổ hợp có hoạt tính từ *E. coli* làm nguồn được hiệu chế tạo thuốc điều trị ĐTĐ ở Việt Nam, chúng tôi dòng hóa gen *10xhis-rr-mpi* mã hóa 10xHis-RR-MPI vào plasmid biểu hiện pET-43.1a(+) để tạo plasmid tái tổ hợp pHTI, biến nạp pHTI vào *E. coli* BL21(DE3), cảm ứng biểu hiện và tinh chế thu nhận 10xHis-RR-MPI để cung cấp cho quá trình tải gấp cuộn tạo cấu hình đúng của insulin.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng chủ và plasmid

Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α [*F*-*endA1 hsdR17 (rk-mk-)* *supE44 thi X recA1 gyrA96 Δ lacU169 (ϕ 80 *lacZ* Δ M15)] (Takara) được sử dụng để nhân bản plasmid. *E. coli* BL21(DE3) [*F*-, *ompT*, *hsdS (r_g-m_g)*, *gal* (DE3)] được sử dụng làm tế bào chủ biểu hiện vượt mức 10xHis-RR-MPI.*

Plasmid pET-43.1a(+) (Novagen), kích thước 7275bp, promoter T7, cảm ứng bằng IPTG (isopropyl β -D thiogalactoside), gen kháng ampicillin (Amp) được dùng để cấu trúc plasmid pHTI biểu hiện 10xHis-RR-MPI.

Môi

Cặp môi mỗi HTI-F (5'-CCCATGGGTCATATGCCGTCCGACAAACCGCA CCATCACCATCACCATCACCATCACCATTCCTCCGGTCGTCGTTTTGTGAACCAGC-3') và HTI-R (5'-TTGATCCTCGAGGGATCCCTAGTTGCAGTAGTTTTCCAGCTGGTACAGGCTGCAGATGGAGG-3') dùng để khuếch đại gen *mpi*, được thiết kế bằng phần mềm Jellyfish 3.0, Amplify 1.2. Cặp môi T7 promoter/T7 terminator (Novagen) dùng để giải trình tự. Vị trí nhận biết của *NdeI* và *XhoI* dùng cho dòng hóa được gạch dưới, trình tự mã hóa 10xHis được in nghiêng, trình tự mã hóa 2 arginine được in đậm và gạch dưới.

Tách chiết plasmid

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

Khuếch đại và xử lý gen *mpi*

Gen *mpi* mã hóa MPI được khuếch đại bởi *Pfu* DNA polymerase (Fermentas) từ plasmid pBlns (cung cấp bởi PTN Công nghệ Sinh học Phần tử, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên TP HCM) theo chương trình: 95°C/5 phút; 30 chu kỳ: 94°C/45 giây, 55°C/45 giây, 72°C/45 giây; kết thúc, 72°C/10 phút.

Sản phẩm khuếch đại được phân đoạn bằng gel agarose 1%, tinh chế bằng EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction kit (BioBasic, Canada) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, xử lý bằng *NdeI* và *XhoI*, bất hoạt enzyme bằng phenol/chloroform và tinh chế bằng EZ-10 Spin Column PCR Products Purification kit (BioBasic, Canada). Kiểm tra kích thước và nồng độ đoạn DNA mang gen mã hóa 10xHis-RR-MPI trên gel agarose 1%.

Cấu trúc plasmid tái tổ hợp pHTI mang gen mã hóa 10xHis-RR-MPI

Plasmid pHTI biểu hiện 10xHis-RR-MPI được cấu trúc bằng cách chèn gen *10xhis-rr-mpi* đã xử lý với *NdeI* và *XhoI* vào plasmid pET-43.1a(+) cũng được xử lý với hai enzyme này dưới sự xúc tác của T4 DNA ligase (Fermentas). pET-43.1a(+) được xử lý với *NdeI* và *XhoI*, phân đoạn sản phẩm cắt bằng gel agarose 1% để loại bỏ thể Nus có kích thước 1787 bp và tinh chế bằng EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction kit.

Tạo tế bào khả nạp và biến nạp plasmid pHTI vào tế bào *E. coli*

Tạo tế bào *E. coli* khả nạp bằng phương pháp calcium lạnh và pHTI được biến nạp vào *E. coli* DH5 α 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 μ g/ml (LBA-Amp100), ở 37°C, 14 - 16 h.

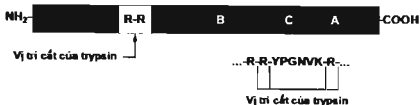
Sàng lọc thể biến nạp và giải trình tự DNA

Thể biến nạp mọc thành khuẩn lạc trên LBA-Amp100 được sàng lọc để chọn dòng mục tiêu bằng PCR khuẩn lạc với cặp môi HTI-F/HTI-R. 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 *NdeI* và *XhoI*.

Plasmid tái tổ hợp cho kết quả dương tính ở phản ứng cắt sẽ giải trình ở công ty Macrogen (Hàn

Quốc). Sự đồng khung dịch mã được kiểm tra bằng phần mềm Jellyfish.

Cấu trúc protein dung hợp 10xHis-RR-MPI được mô tả ở hình 1.



Hình 1. Cấu trúc protein dung hợp 10xHis-RR-MPI. MPI gồm đoạn B, mini C và đoạn A. B nối với C qua trung gian 2 arginine (RR) và C nối với A qua trung gian lysine và arginine (K-R). Đây là những vị trí cắt tự nhiên của trypsin trong PI, tiền chất tạo trong cơ thể người. Sau khi tái gấp cuộn để hình thành cấu nối S-S giữa đoạn B và A, thể 10xHis và mini C được cắt ra khỏi cấu trúc dung hợp 10xHis-RR-MPI bằng trypsin, chuỗi B và A còn lại chính là cấu trúc của insulin.

Cảm ứng và phân tích biểu hiện 10xHis-RR-MPI

E. coli BL21(DE3) chứa pHT1 [*E. coli* BL21(DE3)/pHT1] được cảm ứng biểu hiện 10xHis-RR-MPI theo sự hướng dẫn của công ty Novagen. Nuôi *E. coli* BL21(DE3)/pHT1 trong 50ml LB-Amp100 (không bổ sung agar), lắc 250 v/p, 37°C đến khi OD₆₀₀ đạt 0,6 - 0,8, bổ sung IPTG đạt 0,4 mM để cảm ứng sự biểu hiện 10xHis-RR-MPI, tiếp tục nuôi lắc thêm 10 h. Thu và rửa sinh khối tế bào, huyền phù tế bào trong đệm lạnh (Tris-HCl 10mM, 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 tổng protein.

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

Sự biểu hiện 10xHis-RR-MPI 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 10xHis-RR-MPI được xác định bằng phẩm nhuộm Quantity-One (BioRad), khối lượng phân tử 10xHis-RR-MPI được so với thang phân tử lượng thấp (Amersham).

Lai Western

10xHis-RR-MPI được phát hiện nhờ kháng thể kháng đặc hiệu polyhistidine (Amersham) và kháng thể HUT-018 (Novo Nordisk, Đan Mạch) kháng đặc hiệu insulin. Protein được chuyển lên màng nitrocellulose sau SDS-PAGE, hiện phim nhờ ECL kit (Amersham).

Tính chất 10xHis-RR-MPI

Thế vùi 10xHis-RR-MPI được hòa tan và sulfonat hóa theo mô tả của Cowley và Mackin (1997). 10xHis-RR-MPI được tinh chế bằng cột HisTrap FF 5ml (Amersham) trong điều kiện biến tính như mô tả bởi công ty Qiagen (2001) trên hệ thống FPLC (Amersham). Cân bằng cột 3CV (CV, dung tích cột) dung dịch A (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-HCl, 6M ure, 5mM imidazole, pH 8,0), rửa cột 4CV dung dịch B (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris - HCl, 6M ure, 40mM imidazole, pH 6,3), dung ly với 3 CV dung dịch C (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris - HCl, 4M ure, 500mM imidazole, pH 4,5), vận tốc dòng 1 ml/phút. Nồng độ protein được xác định bằng phương pháp Bradford (Bradford, 1976).

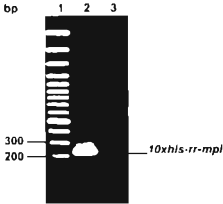
KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

Khuếch đại gen *mpi* bằng PCR và cấu trúc plasmid tái tổ hợp pHT1

Gen *mpi* được khuếch đại từ plasmid pBlns để đồng hóa vào pET-43.1a(+) tạo plasmid tái tổ hợp pHT1 bằng cặp mồi HTI-F/HTI-R. Mỗi xuôi HTI-F mang trình tự mã hóa vị trí cắt của *Nde*I ở đầu 5', vị trí cắt của trypsin ở giữa thế tinh chế 10xHis và MPI, mỗi ngược HTI-R mang trình tự mã hóa vị trí cắt của *Xho*I. Sản phẩm khuếch đại được phân tích trên gel agarose 1% như mô tả ở hình 2.

Kết quả phân tích trên gel agarose cho thấy, sản phẩm khuếch đại gen mục tiêu *10xhis-rr-mpi* cho 1 vạch duy nhất có kích thước khoảng 250 bp (Hình 2, giếng 2), kích thước này đúng với kích thước mong muốn; trong khi đó, ở mẫu đối chứng với khuôn là

plasmid pBluescript II KS (+), đây là plasmid được sử dụng để cấu trúc pBlns, không xuất hiện vạch DNA (Hình 2, giếng 3). Những kết quả này cho thấy cặp môi HTI-F/HTI-R có độ chuyên biệt cao và sản phẩm khuếch đại là đoạn gen mã hóa 10xHis-RR-MPI mong muốn.



Hình 2. Sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen *10xhis-rr-mpi* bằng cặp môi HTI-F/HTI-R từ pBlns. 1, thang DNA 100 bp; 2, sản phẩm khuếch đại từ pBlns. 3, sản phẩm khuếch đại từ pBluescript II KS (+).

Sản phẩm mang gen mã hóa 10xHis-RR-MPI được tinh sạch, xử lý bằng *NdeI/XhoI* và dòng hóa vào pET43.1a(+) cũng được xử lý bằng cặp enzyme *NdeI/XhoI*. Sản phẩm nối được biến nạp vào *E. coli*

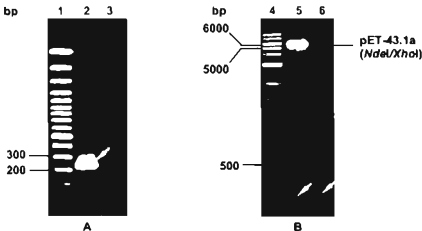
DH5a, trải trên LBA-Amp100, ở 37°C, 14-16 h để tiếp tục sàng lọc chọn thể biến nạp mang plasmid tái tổ hợp pHTI cần tìm.

Tuyển chọn dòng *E. coli* DH5a mang plasmid tái tổ hợp pHTI

Các khuẩn lạc mọc trên LBA-Amp được sàng lọc để tuyển chọn dòng *E. coli* DH5a mang plasmid tái tổ hợp pHTI mong muốn bằng PCR khuẩn lạc với cặp môi HTI-F/HTI-R, cắt hạn chế và giải trình tự DNA.

Lấy một ít sinh khối ở từng khuẩn lạc hòa vào dung dịch chứa thành phần phản ứng PCR ở các tube PCR riêng rẽ, thực hiện phản ứng, phân tích kích thước sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose 1% như mô tả ở hình 3.

Những khuẩn lạc cho sản phẩm PCR có kích thước khoảng 250 bp (Hình 3A, giếng 2), chứng tỏ những khuẩn lạc này mang plasmid pHTI được cấu trúc do gen *10xhis-rr-mpi* đã được gắn vào vị trí cắt của *NdeI* và *XhoI* trong pET-43.1a. Sự hiện diện của khuôn pHTI giúp cặp môi HTI-F/HTI-R bắt cặp chuyên biệt vào đầu 5' và 3' của gen *10xhis-rr-mpi* để khuếch đại cho ra sản phẩm PCR duy nhất; trong khi đó với đối chứng là những khuẩn lạc mang plasmid pET-43.1a không xuất hiện vạch DNA (Hình 3A, giếng 3). Những khuẩn lạc cho sản phẩm PCR kích thước 250 bp sẽ được tách chiết plasmid và tiếp tục sàng lọc bằng phản ứng cắt *NdeI* và *XhoI*.



Hình 3. Sản phẩm PCR khuẩn lạc (A) và cắt hạn chế của plasmid tái tổ hợp pHTI (B). 1, thang DNA 100 bp; 2, sản phẩm PCR khuẩn lạc *E. coli* DH5a/pHTI; 3, sản phẩm PCR khuẩn lạc *E. coli* DH5a/pET-43.1a, 4, thang DNA 1 kb; 5, sản phẩm phản ứng cắt pHTI với *NdeI* và *XhoI*; 6, sản phẩm PCR của pBlns với cặp môi HTI-F/HTI-R. Vạch DNA mang gen mã hóa 10xHis-RR-MPI được định vị bởi mũi tên.

Xử lý plasmid thu được từ những khuẩn lạc cho kết quả dương tính khi sàng lọc bằng PCR khuẩn lạc với *NdeI* và *XhoI*, phân tích kích thước sản phẩm cắt bằng điện di trên gel agarose 1% như mô tả ở Hình 3B. Kết quả phân tích cho thấy khi cắt bằng *NdeI* và *XhoI*, sản phẩm cắt cho 2 vạch DNA kích thước 5488 và 250 bp (Hình 3B, giếng 5), hai vạch DNA này tương ứng kích thước của pET-43.1a đã xử lý *NdeI/XhoI* để loại bỏ đoạn DNA kích thước 1787 bp mã hóa thể Nus và đoạn DNA mang gen mã hóa 10xHis-RR-MPI.

Đoạn DNA mang gen mã hóa 10xHis-RR-MPI trong pHT1 được giải trình tự và so sánh với trình tự *mpi* trong plasmid pBlns, kết quả cho thấy độ tương đồng đạt 100% và đồng khung dịch mã trên pET-43.1a như mô tả ở hình 4.

Từ những kết quả phân tích trên, cho thấy chúng tôi đã chọn được dòng vi khuẩn *E. coli* DH5 α mang plasmid tái tổ hợp mong muốn pHT1, plasmid này được biến nạp vào *E. coli* BL21(DE3) để tạo chủng *E. coli* BL21(DE3)/pHT1 biểu hiện 10xHis-RR-MPI.

	1	11	21	31	41	51	61	71	
pHT1	TGCCTAAATCCCTCTGAAATATTTCTTAACTTTTAAACAAGCAGATATACATATCTCCCTCCGACAAACCACCATCACTCA								
gene mpi									
Consensus	ATGTTT Start codon								
	8-	91	101	11-	121	131	141	151	
pHT1	TACCACTTACCATCACTCACTCTCTCCGTCGTCTTTTGTGAACCAACATCTGTCTCCCTCCCTACCTCGTGGAGCGCTGT								
gene mpi									
Consensus	TAAAGG Stop codon								
	161	171	181	19-	201	211	221	231	
pHT1	ACCTCGTGTGCGGCACCTGCTCTCTTCTACACCCGAAACCCCTCTGTTACTCGGCTAACTCTTAAATCTGGCAATTCTG								
gene mpi									
Consensus	ATGTTT Start codon								
	241	251	261	27-	281	291	301	311	
pHT1	GAACTGCTCTCTACCTTCATCTCTACGCTGTACAGCTTGAAATTAAGTCTGCAATTAAGGATCTCTCTGATCTACCACTCA								
gene mpi									
Consensus	TAAAGG Stop codon								
	321	331	341	35-	361	371	381	391	
pHT1	CCACCACTTAAGTTAACTAAGTCTGGCGTTCTCTGCTCTAATAAAGAGATTTCTCTGCGCTCACTAGCTGGCTGGTCTCC								
gene mpi									
Consensus	TAAAGG Stop codon								

Hình 4-Độ tương đồng và sự đồng khung dịch mã của đoạn DNA mã hóa 10xHis-RR-MPI trong pET-43.1a(+).

Cảm ứng và phân tích biểu hiện 10xHis-RR-MPI trong *E. coli* BL21(DE3)/pHT1

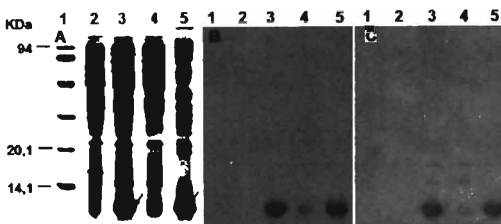
Nhằm đánh giá sự biểu hiện và tìm hiểu đặc tính hiện diện của 10xHis-RR-MPI ở dạng thể vùi hay hòa tan trong tế bào chất, chủng *E. coli* BL21(DE3)/pHT1 được nuôi cấy lắc trong LB-Amp100 và cảm ứng bằng IPTG. Sinh khối tế bào được thu nhận sau 10 h cảm ứng để chuẩn bị mẫu tổng protein, phân đoạn tan (chứa 10xHis-RR-MPI tan) và phân đoạn không tan (chứa 10xHis-RR-MPI dạng thể vùi). Sự hiện diện của 10xHis-RR-MPI 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 5.

Kết quả phân tích SDS-PAGE cho thấy, xuất hiện thêm một vạch protein đậm có kích thước khoảng 9,5 kDa khi cảm ứng IPTG trong dịch tổng protein của *E. coli* BL21(DE3)/pHT1 (Hình 5A, giếng 3), trong khi đó vạch protein này không xuất hiện trong dịch tổng khi không cảm ứng IPTG (Hình 5A, giếng 2). So sánh với trọng lượng phân tử lý thuyết của 10xHis-RR-MPI khoảng 9,58 kDa, cho thấy vạch protein đậm này hiện diện trong dịch tổng được cảm ứng có thể là 10xHis-RR-MPI tái tổ hợp biểu hiện từ pHT1.

Nhằm khẳng định vạch protein được biểu hiện là 10xHis-RR-MPI, chúng tôi phân tích thêm bằng lai Western với kháng thể HUI-018 kháng đặc hiệu insulin và kháng thể đặc hiệu kháng 10xHis, 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 5B và C, giếng 3), kết quả này khẳng định vạch protein được xuất hiện khi được cảm ứng IPTG chính là 10xHis-RR-MPI.



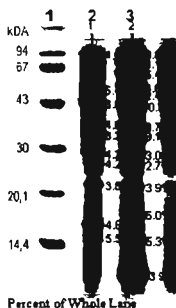
Hình 5 Phân tích sự biểu hiện 10xHis-RR-MPI. Điện di SDS-PAGE (A), lai Western với kháng thể kháng insulin HUI-018 (B), lai Western với kháng thể kháng the 10xHis (C), (+)/(-), cảm ứng/không cảm ứng IPTG: 1, thang protein phân tử lượng thấp; 2, tổng protein *E. coli* BL21(DE3)/pHTI(-); 3, tổng protein của *E. coli* BL21(DE3)/pHTI(+); 4, phân đoạn tan của tế bào chất *E. coli* BL21(DE3)/pHTI(+); 5, phân đoạn lủa của tế bào chất *E. coli* BL21(DE3)/pHTI(+). Vạch protein dung hợp 10xHis-RR-MPI được định vị bởi mũi tên.

Phân tích đặc tính hiện diện của 10xHis-RR-MPI trong *E. coli* BL21(DE3)/pHTI ở phân đoạn protein không tan và tan trong tế bào chất (Hình 5A, giếng 4 và 5), cho thấy hầu hết 10xHis-RR-MPI biểu hiện và tồn tại ở dạng thể vùi, kết quả này cũng được khẳng định bằng lai Western với kháng thể HUI-018 kháng đặc hiệu insulin và kháng thể đặc hiệu kháng 10xHis, khi vạch tín hiệu chỉ xuất hiện ở phân đoạn không tan (Hình 5B và C, giếng 5). Định lượng bằng phần mềm Quantity-One, cho thấy 10xHis-RR-MPI biểu hiện chiếm khoảng 14% tổng protein của tế bào *E. coli* BL21(DE3)/pHTI như mô tả ở Hình 6.

Những kết quả trên chứng tỏ chúng tôi đã thành công trong việc tạo chủng *E. coli* BL21(DE3)/pHTI biểu hiện vượt mức 10xHis-RR-MPI dạng thể vùi.

Nhiều nghiên cứu cho thấy mức độ biểu hiện của PI hoặc MPI trong tế bào chất *E. coli* dao động rất lớn có thể chiếm từ 6 tới 26% tổng protein của tế bào (Wing *et al.*, 1986), 30% (Li *et al.*, 1984), 25% (Chang *et al.*, 1998), 10% (El-Rashdy *et al.*, 2008)... Kết quả này cho thấy mức độ biểu hiện của PI và MPI phụ thuộc rất nhiều yếu tố như loại peptide dung hợp vào đầu N của PI hoặc MPI, loại plasmid biểu hiện, promoter điều khiển sự biểu hiện... Mức độ biểu hiện 10xHis-RR-MPI chiếm 14% tổng

protein của tế bào *E. coli* BL21(DE3)/pHTI mà chúng tôi thu được cho thấy chưa tới giới hạn cuối, điều này mở ra khả năng có thể cải tiến chủng *E. coli* BL21(DE3)/pHTI để đạt hiệu suất biểu hiện tối ưu.



Hình 6. Đánh giá mức độ biểu hiện 10xHis-RR-MPI bằng phần mềm Quantity-One. 1, thang phân tử lượng thấp protein; 2, tổng protein của *E. coli* BL21(DE3)/pHTI không cảm ứng IPTG; 3, *E. coli* BL21(DE3)/pHTI cảm ứng IPTG.

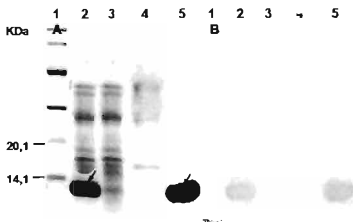
Tính chế 10xHis-RR-MPI

Nhằm cung cấp nguyên liệu cho bước tái gấp cuộn để tạo 3 cầu nối S-S cho phân tử insulin tái tổ hợp, 10xHis-RR-MPI được tính chế bằng sắc ký ái lực dựa trên sự tương tác giữa Ni^{2+} và thẻ 10xHis. Thẻ với 10xHis-RR-MPI đã hòa tan bằng dung dịch biến tính mạnh và sulfonate hóa bằng các muối sulfite được sử dụng để tính chế. Các phân đoạn sau khi gắn trên cột, rửa cột và dung ly được phân tích bằng SDS-PAGE và lai Western như mô tả ở hình 7.

Kết quả phân tích SDS-PAGE và lai Western cho thấy, 10xHis-RR-MPI chiếm chủ yếu trong dịch hòa tan thẻ với nhưng vẫn còn lẫn nhiều protein tạp (Hình 7A và B, giếng 2). Tuy nhiên, những protein tạp này không gắn với cột HisTrap, vì vậy ra khỏi cột ở phần đoạn sau khi gắn và phân đoạn rửa cột (Hình 7A, giếng 3 và 4), đây là những protein không tương tác hay tương tác không đặc hiệu với Ni^{2+} ; trong khi đó, toàn bộ 10xHis-RR-MPI được giữ trên cột do tương tác đặc hiệu với Ni^{2+} vì kết quả Western ở giếng 3, 4 không xuất hiện tín hiệu vạch lai và chỉ dung ly ra khỏi cột khi tăng nồng độ của phân tử cạnh tranh là imidazole (Hình 7A và B, giếng 5). Phần đoạn dung ly cho duy nhất một vạch protein khi nhuộm Coomassie Blue và cho tín hiệu với kháng thể kháng thẻ 10xHis, chứng tỏ trong dung dịch dung ly còn hiện diện rất ít

protein tạp và protein chiếm chủ yếu trong dung dịch dung ly chính là 10xHis-RR-MPI. Định lượng protein bằng phương pháp Bradford cho thấy đã thu được 18,9 mg 10xHis-RR-MPI từ 500 ml môi trường LB bằng nuôi cấy lắc.

Pet và đồng tác giả (1996) chen các vị trí cắt của trypsin là arginine (R), lysine (K) và lysine-arginine (KR) bằng công nghệ gene vào giữa thẻ tính chế ZZ và PI, tạo 3 cấu trúc protein dung hợp ZZ-R-PI, ZZ-K-PI và ZZ-KR-PI để xác định hiệu quả cắt của trypsin đối với những vị trí này. Các cấu trúc này được biểu hiện ở dạng thẻ với trong *E. coli* và tính chế bằng sắc ký ái lực với IgG (Z là vùng gắn với IgG của protein A ở *Staphylococcus*). Điểm nổi bật của nghiên cứu này là sử dụng trypsin để loại ZZ và peptide C trong cùng một phản ứng thay vì phải trải qua hai phản ứng riêng rẽ là loại bỏ ZZ và sau đó là peptide C. Nhờ đó quá trình thu nhận insulin người tái tổ hợp có hoạt tính từ *E. coli* được rút ngắn về thời gian. Tuy nhiên, sử dụng ZZ làm thẻ tính chế là không kinh tế vì giá thẻ mang IgG dùng trong sắc ký tính chế có giá thành quá cao. Để sản xuất insulin tái tổ hợp ở quy mô lớn, việc thay ZZ bằng thẻ tính chế His là cần thiết, vì giá thẻ mang Ni^{2+} cần cho tính chế những protein được dung hợp với thẻ His có giá thành rẻ, dễ dàng và thuận tiện cho sử dụng (Qiagen).



Hình 7. Tính chế 10xHis-RR-MPI bằng cột HisTrap FF 5ml trong điều kiện biến tính Điện di SDS-PAGE (A); lai Western với kháng thể kháng thẻ 10xHis (B). 1, thang protein phân từ lượng thấp; 2, dịch hòa tan thẻ với 10xHis-RR-MPI trước tính chế, 3, phần đoạn sau khi gắn trên cột; 4, phần đoạn rửa cột; 5, phần đoạn dung ly 10xHis-RR-MPI được định vị bởi môi trường

Chu Kỳ Nam và đồng tác giả (2005) đã cấu trúc và biểu hiện vượt mức protein dung hợp 6xHis-M-MPI dạng thẻ với trong *E. coli* để sản xuất insulin tái tổ hợp. Việc sử dụng thẻ His đã giảm đáng kể giá

thành trong quá trình tính chế và dễ dàng sử dụng cho quy mô sản xuất lớn, ngoài ra việc thay PI bằng MPI cũng là một ưu điểm trong nghiên cứu này vì MPI có hiệu suất tái gấp cuộn cao hơn PI từ 20-40% (Chang

et al., 1998). Tuy nhiên, MPI được cấu trúc gắn với thể tinh thể His qua trung gian methionine (M) đã bộc lộ nhược điểm trong nghiên cứu này, vì thể His và mini C phải được loại ra ở hai bước riêng rẽ khi muốn thu nhận insulin. Hơn nữa, chúng tôi gặp rất nhiều khó khăn trong việc mua CNBr vì hiện nay hóa chất này đã bị cấm sử dụng ở Việt Nam. Chính những điều này đã ảnh hưởng rất nhiều về mặt thời gian trong quy trình sản xuất insulin tái tổ hợp. Bằng những phân tích tài liệu và kinh nghiệm trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi tiến hành cấu trúc protein dung hợp 10xHis-RR-MPI để khắc phục những nhược điểm đã nêu và kỳ vọng đạt được những kết quả quan trọng trong quá trình sản xuất insulin tái tổ hợp có hoạt tính từ *E. coli*.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thành công trong việc đồng hóa gen *10xhis-rr-mpi* vào chủng *E. coli* BL21(DE3)/pHT1, biểu hiện vượt mức 10xHis-RR-MPI bằng cảm ứng IPTG và tinh sạch được 10xHis-RR-MPI bằng một bước sắc ký ái lực do tương tác giữa 10xHis và Ni^{2+} . 10xHis-RR-MPI sau tinh chế sẽ được tái gấp cuộn để tạo các cầu nối S-S, xử lý với trypsin để loại bỏ 10xHis và đoạn mini C trong cùng một phản ứng.

Lời cảm ơn: nghiên cứu này là một phần của đề tài cấp Nhà nước KC 04.09/06-10, chúng tôi cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tài trợ kinh phí cho đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Berg H, Walter M, Mauch L, Seissler J, Northemann W (1993) Recombinant human preproinsulin Expression, purification and reaction with insulin autoantibodies in sera from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Immunol Methods* 164: 221-231.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Chem* 72: 248-254.
- Chang SG, Kim DY, Choi KD (1998) Human insulin production from a novel mini-proinsulin which has high

receptor-binding activity. *Biochem J* 329: 631-635

Chen JQ, Zhang HT, Hu MII, Tang JG (1995) Production of human insulin in an *E. coli* system with Met-Lys-human proinsulin as the expressed precursor *Appl Biochem Biotechnol* 55: 5-15

Chu Kỳ Nam, Hoàng Văn Quốc Chương, Trần Linh Thuộc (2005) Tạo dòng và biểu hiện mini-proinsulin người tái tổ hợp trong *Escherichia coli*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 3(2): 155-160.

Cowley DJ, Mackin RB (1997) Expression, purification and characterization of recombinant human proinsulin *FEBS Lett* 402: 124-130.

El-Rashdy MR, Saleh MM, Gamal AA, Ehab AS (2008) Synthesis of the human insulin gene: protein expression, scaling up and bioactivity. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 38: 24-39

Ho RJY, Gibaldi M (2003) Biotechnology and Biopharmaceuticals. Transforming Proteins and Genes into Drugs. Wiley-Liss.

Kemmler W, Peterson JD, Steiner DF (1971) Studies on the conversion of proinsulin to insulin *J Biol Chem* 246: 6786-6791.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* 227: 680-685

Li HG, Piotr PS, Tso JY, Roland B, Saran N, David YT, Ray W (1984) Synthesis of human insulin gene VIII Construction of expression vectors for fused proinsulin production in *Escherichia coli*. *Gene* 29: 251-254.

Per J, Joakim N, Elisabet S, Tomas M, Stefan S, Mathias U (1996) Single-step trypsin cleavage of a fusion protein to obtain human insulin and its C peptide. *Eur J Biochem* 236: 656-661.

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

The QIAexpressionist™ (2001) *A Handbook for High-Level Expression and Purification of 6xHis-Tagged Proteins*, 5th ed Qiagen, German.

Wing LS, Fei LY, Diana MZ, Saran AN (1986) Short synthetic oligodeoxynucleotide leader sequences enhance accumulation of human proinsulin synthesized in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 561-565.

Zimmerman S, Scheraga H (1977) Local interactions in bends of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 4126-4129.

CLONING, EXPRESSION AND PURIFICATION OF FUSION PROTEIN 10xHIS-RR-MINIPROINSULIN (10xHIS-RR-MPI) FROM *ESCHERICHIA COLI*

Le Tran Thanh Nhat, Vo Minh Tri*, Nguyen Thi My Trinh, Tran Linh Thuoc

University of Science, Vietnam National University, HoChiMinh City

SUMMARY

10xHis-RR-MPI was designed to shorten the process of producing recombinant human insulin for treatment of diabetes in Vietnam. Trypsin cleavage sites (RR) were inserted between 10xHis tag and MPI, thus 10xHis tag and mini-peptide C were removed from refolded 10xHis-RR-MPI in one step under the catalysis of trypsin protease. Gene *10xhis-rr-mpi* was amplified by PCR, cloned into pET-43.1a(+) to construct recombinant plasmid pHT1 expressing 10xHis-RR-MPI under the control of T7 promoter. *E. coli* BL21(DE3)/pHT1 strain was established by chemical transformation of pHT1 into *E. coli* BL21(DE3), shakily cultivated in LB medium, added IPTG to induce the T7 promoter. 10xHis-RR-MPI was over-expressed and accumulated as inclusion bodies in cytoplasm and occurred about 14% of total protein after 10 h induction when analyzing by SDS-PAGE, Western blot, and Quantity-One software. 10xHis-RR-MPI was purified through a one-step Ni-NTA affinity column under denaturing conditions. 18,9 mg of purified 10xHis-RR-MPI was obtained from 500 ml LB medium of shakily cultured recombinant bacteria when quantifying protein using Bradford method.

Keywords *E. coli*, pET-43 1a, recombinant insulin, SDS-PAGE, trypsin, Western blot

* Author for correspondence: Tel: +84-8-38301331; E-mail: trivm1976@yahoo.com