

TẠO DÒNG VI KHUẨN *ESCHERICHIA COLI* BIỂU HIỆN PROTEIN DUNG HỢP ECOTIN-MINIPROINSULIN DẠNG TAN TRONG CHU CHẤT

Mai Hương Trà ¹, Võ Minh Trí ², Trần Linh Thuớc ²

¹ Trường Đại học Lạc Hồng, email: huongtra1983@yahoo.com.vn

² Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Tp. HCM

TÓM TẮT

Đái tháo đường (ĐTĐ) là bệnh rối loạn chuyển hóa đường làm đường glucose trong máu tăng cao đưa đến nước tiểu có đường, cơ thể bị nhiễm độc keto axit, kèm theo triệu chứng ăn nhiều, uống nhiều, tiểu nhiều, gầy nhanh... Bệnh xảy ra do hormone insulin của tuyến tụy bị thiếu hoặc insulin đủ nhưng hoạt động kém hiệu quả (Gleslie R.D, 1994). Những nghiên cứu trên thế giới cho thấy rằng Ecotin, protein ức chế trypsin ở *E. coli* được tổng hợp và tiết vào chu chất nhờ một trình tự tiết nằm ở đầu N của Ecotin. Bằng cách dung hợp trình tự tiết và trình tự mã hóa Ecotin vào đầu N của proinsulin thì proinsulin sẽ được chuyển vào chu chất và sự tái gấp cuộn của proinsulin có hiệu quả cao so với việc dung hợp với các peptide tín hiệu của các gen *pelB*, *dsbA*, hay *ompT* (Ajamaluddin Malik và ctv, 2007). Trong nghiên cứu này, trình tự tiết và trình tự mã hóa Ecotin được sử dụng để dung hợp với đầu N của mini-proinsulin (MPI) để cấu trúc dòng vi khuẩn *E. coli* có khả năng biểu hiện Ecotin-mini-proinsulin dạng tan trong chu chất có cấu hình gấp cuộn tự nhiên. Dòng tái tổ hợp này sẽ sử dụng như là nguồn giống để tạo insulin tái tổ hợp có hoạt tính dùng trong sản xuất thuốc chữa bệnh ĐTĐ.

Từ khóa: Đái tháo đường, ecotin, insulin.

ABSTRACT

Diabetes caused by a relative insulin deficiency due to decreased insulin sensitivity is one of the leading reasons of morbidity and mortality in many countries. Native proinsulin belongs to the class of the difficult-to-express proteins in *Escherichiacoli*. Problems mainly arise due to its small size, a high proteolytic decay, and the necessity to form anative disulfide pattern. In the present study, human mini-proinsulin was produced in the periplasm of *E. coli* as a fusion to ecotin, which is a small periplasmic protein of 16 kDa encoded by the host, containing one disulfide bond. Ecotin will help fold mini-proinsulin precisely and natively. Proteins were extracted from the periplasm by osmotic shock treatment. The fusion protein was secreted to the periplasm and was determined by SDS-PAGE and Western blot.

Keywords: ecotin, miniproinsulin, periplasm, folding.

1. GIỚI THIỆU

Số lượng bệnh nhân ĐTĐ ngày càng gia tăng tạo ra nhu cầu rất lớn về insulin. Tuy nhiên, nguồn insulin li trích từ động vật không đủ và có nhiều rủi ro nên việc sản xuất insulin người bằng con đường protein tái tổ hợp đã và đang là giải pháp hiệu quả nhất hiện nay. Bên cạnh đó, việc sử dụng vi khuẩn Gram âm *E. coli* là một trong những ưu tiên làm tế bào chủ trong sản xuất protein tái tổ hợp do khả năng sinh sản nhanh, đạt mật độ cao trong những môi trường nuôi cấy rẻ tiền đồng thời bộ gen của *E. coli* đơn giản và đã được giải trình tự. Thông thường, khi sử dụng *E. coli* làm tế bào chủ để sản xuất protein tái tổ hợp thì những protein này được định vị trong tế bào chất. Đây là môi trường khử nên những protein

mục tiêu biểu hiện vượt mức thường có xu hướng kết tụ, hình thành một dạng không tan (thể vùi) và protein không có hoạt tính do cấu hình không chính xác (Zhang Y. và ctv, 1998). Để phục hồi hoạt tính mong muốn của protein mục tiêu, đầu tiên thể vùi (protein mục tiêu) phải được tách chiết từ tế bào chất, hòa tan thể vùi và phải được tái gấp cuộn để có cấu hình chính xác. Tuy nhiên, hiệu suất của quá trình tái gấp cuộn còn tùy thuộc rất nhiều yếu tố, một trong những yếu tố quan trọng nhất chính là protein mục tiêu. Nếu phân tử protein mục tiêu ở dạng tự nhiên càng có nhiều cầu nối disulfide, thì quá trình tái gấp cuộn càng có hiệu quả thấp. Trong phân tử insulin tự nhiên có 3 cầu nối disulfide và chính sự hiện diện của 3 cầu nối này làm cho hiệu suất tái gấp cuộn proinsulin không cao khi biểu hiện vượt mức trong tế bào chất của *E. coli* (A.Mc. Cormack và A. McElduff, 2004).

Những nghiên cứu trên thế giới cho thấy rằng ecotin ở *E. coli* được tổng hợp và tiết vào chu chất nhờ một trình tự tiết nằm ở đầu N. Bằng cách dung hợp trình tự tiết và trình tự mã hóa ecotin vào đầu N của proinsulin thì proinsulin sẽ được chuyển vào chu chất, giúp cho proinsulin có cấu hình tự nhiên. Mặt khác, khi dung hợp với tín hiệu tiết là ecotin thì hiệu suất proinsulin thu được cao hơn hẳn so với việc dung hợp với các peptide tín hiệu của các gen *pelB*, *dsbA*, hay *ompT* với năng suất đạt được là 51mg proinsulin/l dịch lên men (Ajamaluddin Malik và ctv, 2007).

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Chúng chủ *E. coli* DH5 α [*F*, ϕ 80*lacZ* Δ M15, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *phoA*, *supE44*, λ , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*] được dùng để dòng hóa các gen và tạo lượng lớn các plasmid tái tổ hợp; Chúng chủ *E. coli* B834(DE3) [*F* *ompT* *hsdS_B*($r_B^-m_B^-$) *gal dcm met* (DE3)] được dùng để nghiên cứu sự biểu hiện gen trong plasmid pET43EMPI; Chúng chủ *E. coli* W3110 [*F* λ *rph-1 INV*(*rrnD*, *rrnE*)] dùng để tách bộ gen.

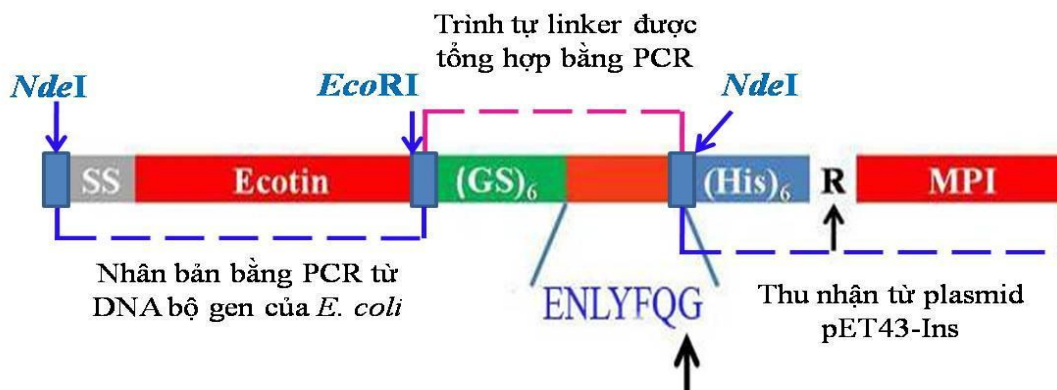
Plasmid pGEcolin được dùng để thu nhận gen mã hóa ecotin và trình tự linker; plasmid pET43-Ins chứa gen mã hóa cho mini-proinsulin.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Cấu trúc gen mpi để được biểu hiện dạng tan trong chu chất *E. coli*

Nhằm biểu hiện MPI ở dạng tan trong chu chất của *E. coli*, chúng tôi chọn phương án dung hợp trình tự mã hóa MPI với trình tự mã hóa ecotin và thẻ 6xHis ở đầu N. Trình tự tín hiệu (ss) và gen mã hóa ecotin giúp cho MPI được biểu hiện trong chu chất *E. coli*. Thẻ 6xHis giúp cho bước tinh chế bằng phương pháp sắc kí ái lực với cột Ni-NTA. (GS)₆ (trình tự lặp lại 6 lần của Gly-Ser) giúp tạo ecotin ở dạng dimer đồng hóa trị. Ngoài ra, một vị trí cắt của TEV protease (ENLYFQG) đã được chèn vào cấu trúc này giữa ecotin và 6xHis có vai trò giúp loại bỏ ecotin ra khỏi protein dung hợp 6xHis-MPI. Một gốc methionine (R) được chèn giữa thẻ 6xHis và MPI giúp việc loại bỏ thẻ 6xHis khỏi MPI bằng CNBr. Do đó, chỉ bằng một bước tinh chế bằng phương pháp sắc kí ái lực với cột Ni-NTA và xử lý bằng cặp enzyme trypsin/ carboxypeptidase B, chúng tôi dự kiến có thể thu nhận được insulin hoàn chỉnh giống với cấu trúc tự nhiên. Cấu trúc gen để biểu hiện MPI dung hợp với ecotin và 6xHis trong chu chất *E. coli* để thu nhận insulin được minh họa ở Hình 1. Cấu trúc này được tạo thành bằng cách thu nhận gen mã hóa ecotin và trình tự linker từ plasmid pGEcolin và nối vào trình tự mã hóa 6xHis-MPI trong plasmid pET43-Ins tại vị trí tương ứng với đầu

N của 6xHis-MPI để có được plasmid pET43EMPI biểu hiện MPI ở dạng dung hợp với ecotin (Hình 1).



Hình 1. Sơ đồ mô tả cấu trúc trình tự mã hóa protein dung hợp ecotin-MPI được dòng hóa trong pET43EMPI. Đoạn gen mã hóa ecotin gồm trình tự tín hiệu (ss) và gen cấu trúc được dung hợp ở đầu N của MPI. Đoạn linker gồm trình tự lặp lại của 6 Gly-Ser và một vị trí cắt của TEV protease. Thẻ 6His và gốc methionine (R) giúp loại bỏ thẻ 6His và MPI bằng CNBr. Vị trí cắt protease được chỉ bằng mũi tên.

2.2.2. Cảm ứng biểu hiện ecotin-MPI trong phân đoạn chu chất của *E. coli*

Cảm ứng biểu hiện ecotin-MPI

Cấy một khuẩn lạc của dòng *E. coli*/ pET43EMPI vào bình nuôi cấy chứa 5ml LB lỏng có bổ sung ampicillin 100µg/ml. Nuôi cấy qua đêm, 37°C. Hút dịch huyền phù tế bào chuyển vào bình nuôi cấy mới chứa 10ml LB lỏng có bổ sung ampicillin 100µg/ml. Nuôi cấy lắc ở 37°C đến khi OD₆₀₀ của dịch nuôi cấy đạt đến 0,8. Bổ sung IPTG sao cho nồng độ cuối đạt 0,5mM và tiếp tục nuôi cấy lắc ở 25°C, trong 24 giờ. Ly tâm thu sinh khối ở thời điểm OD₆₀₀ = 2,5 với tốc độ 10.000 vòng/phút, 5 phút, nhiệt độ phòng. Rửa sinh khối tế bào 2 lần với nước cất. Ly tâm 10.000 vòng/phút, 5 phút, loại bỏ hết phần dịch. Hòa sinh khối trong 100µl dH₂O. Bổ sung tiếp 25µl dung dịch nạp mẫu điện di protein 5X. Vortex đều, đun sôi 100°C, trong 10 phút. Ủ ngay vào đá lạnh trong 15 phút để biến tính protein. Ly tâm thu dịch nổi 10.000 vòng/phút, 5 phút, 4°C và phân tích bằng điện di SDS-PAGE.

Tạo shock thẩm thấu và kiểm tra khả năng tiết của ecotin-MPI trong chu chất

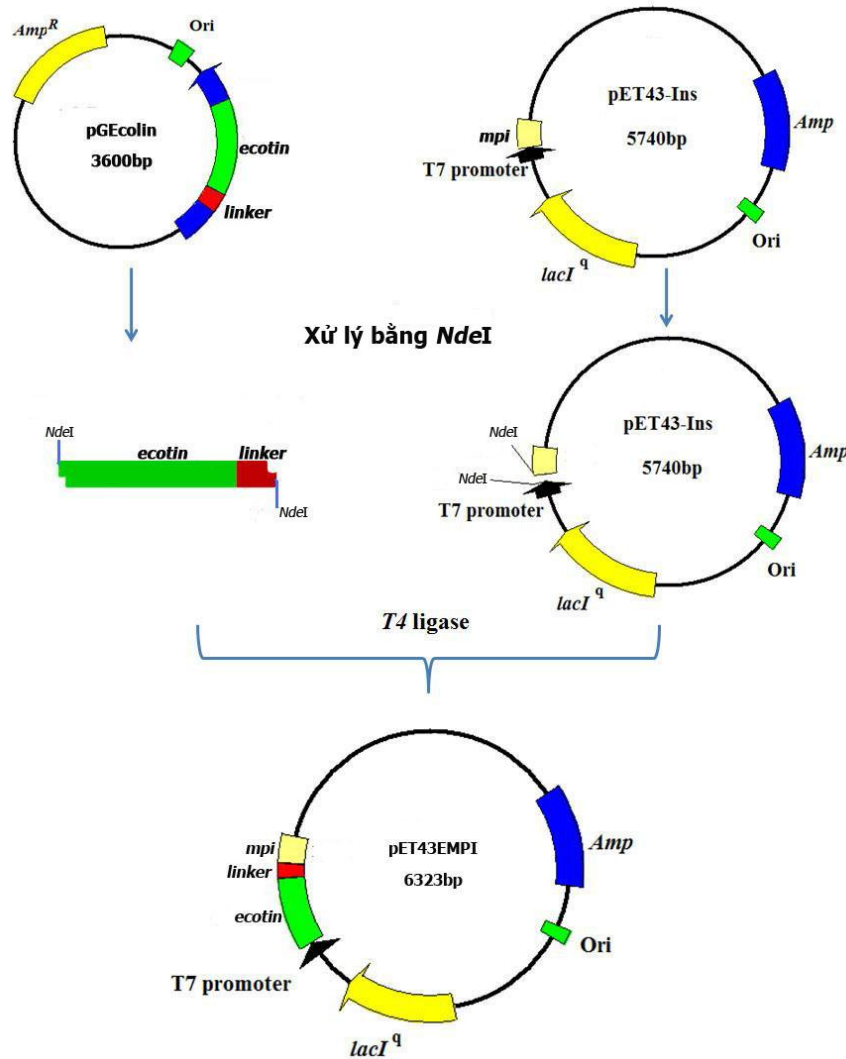
Thu 1,5ml dịch nuôi cấy đã cảm ứng bằng IPTG vào eppendorf. Ly tâm 10.000 vòng, 5 phút. Sinh khối được huyền phù trong 200µl dung dịch chứa sucrose 25%, Tris-HCl 0,3M, MgCl₂ 0,5mM, EDTA 1mM, pH 8. Để eppendorf ở nhiệt độ phòng 30 phút. Ly tâm 13.000 vòng, 5 phút, 4°C. Dịch nổi được loại bỏ và cặn được làm tan trong 100µl dung dịch đã làm lạnh chứa MgCl₂ 0,5mM, EDTA 1mM, Tris-HCl 10mM, pH 8, để trong đá 30 phút. Ly tâm 13.000 vòng, 15 phút, 4°C. Dịch nổi (phân đoạn chu chất) được thu nhận (Ajamaluddin Malik et al, 2007). Cặn tủa (phân đoạn tế bào chất) được huyền phù trong nước. Phân tích sự hiện diện của ecotin-MPI trong chu chất và trong tế bào chất bằng điện di SDS-PAGE.

Xác nhận protein dung hợp ecotin-MPI bằng Western blot

Gồm các bước chuyển màng, khóa màng, phát hiện protein bắt đặc hiệu với kháng thể kháng HUI-18 và hiện phim.

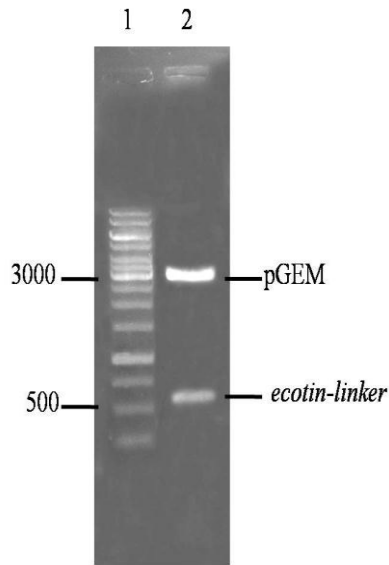
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo plasmid pET43EMPI biểu hiện ecotin-miniproinsulin trong chu chất *E. coli*



Hình 2. Quy trình thiết lập plasmid pET43EMPI biểu hiện MPI dung hợp với ecotin dạng tan trong chu chất

Plasmid pET43.1.a biểu hiện ecotin-MPI được đặt tên là pET43EMPI được tạo thành từ pGEcolin (mang gen mã hóa ecotin + linker) và pET43Ins (mang gen và biểu hiện MPI trong *E. coli*) (Hình 2). Plasmid pET43Ins được tách chiết từ dòng tế bào *E. coli* DH5 α /pET43Ins và được cắt mở vòng bằng *NdeI*. Gen *ecotin-linker* được thu nhận từ plasmid pGEcolin bằng enzyme *NdeI* cho ra sản phẩm có kích thước khoảng 581bp (Hình 3, giếng 2). Gen *ecotin-linker* được nối vào plasmid pET43Ins đã được mở vòng bằng *NdeI*. Biến nạp hỗn hợp sản phẩm nối vào *E. coli* DH5 α và trải trên môi trường LB-Amp. Các khuẩn lạc mọc trên môi trường LB-Amp là thể biến nạp chứa plasmid tái tổ hợp pET43EMPI. Plasmid tái tổ hợp pET43EMPI được tách chiết và được kiểm tra bằng phương pháp PCR và phương pháp cắt giới hạn.

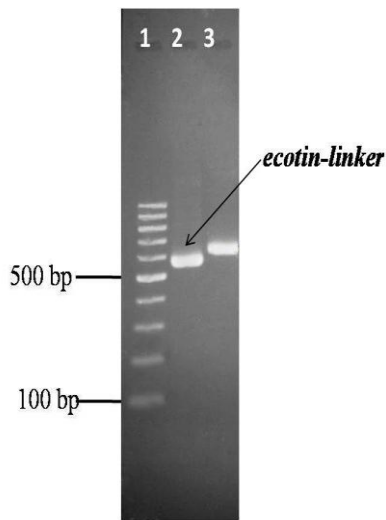


Hình 3. Kiểm tra thể plasmid pGEcoLin bằng enzyme cắt giới hạn

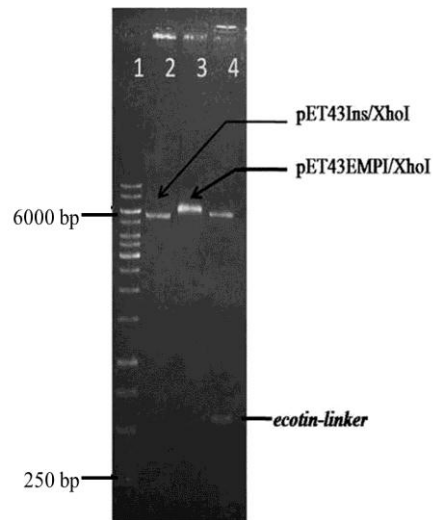
1, Thang DNA 1kb; 2, Sản phẩm cắt với NdeI

Kết quả PCR plasmid trên gel agarose 1% với cặp mồi chuyên biệt *Ec_NdeIF/A2R* cho thấy có vạch DNA đậm mang kích thước tương ứng với kích thước đoạn gen *ecotin-linker* khoảng 581bp (*Hình 4, giếng 2*). Đồng thời khi PCR plasmid pET43EMPI với cặp mồi T7P/A2R để kiểm tra chiều thì được vạch có kích thước tương đương với vạch khoảng 631bp (như dự đoán) (*Hình 5, giếng 3*).

Plasmid pET43EMPI được cắt bằng NdeI đã cho ra 2 vạch: vạch lớn có kích thước 5.740bp (*Hình 5, giếng 3*) tương ứng với vạch của pET43Ins khi cắt bằng XhoI (*Hình 5, giếng 2*) và vạch bên dưới nhạt hơn có kích thước khoảng 581bp (*Hình 5, giếng 4*) tương ứng với kích thước đoạn gen *ecotin-linker*.



Hình 4. Kiểm tra pET43EMPI bằng PCR. 1, Thang 100bp; 2, Cặp mồi *Ec_NdeIF/A2R*; 3, Cặp mồi T7P/A2R



Hình 5. Kiểm tra pET43EMPI bằng enzyme cắt giới hạn. 1, Thang 1kb; 2, pET43Ins/XhoI; 3, pET43EMPI/XhoI; 4, pET43EMPI/NdeI

Plasmid pET43EMPI sau khi được kiểm tra bằng phương pháp PCR và cắt giới hạn được giải trình tự. Kết quả (*Hình 6*) cho thấy gen *ecotin-linker* được chèn vào đồng khung với plasmid pET43Ins.

1	11	21	31	41	51	61	71
RET43-EMPI	GCCTGACGATTCCTCTGAAATATTTTGTATTTTAAAGAGATATA	TATGAAAGATTTCTA	TTGATTTATTT				
EcotIn-MPI	GCCTGACGATTCCTCTGAAATATTTTGTATTTTAAAGAGATATA	TATGAAAGATTTCTA	TTGATTTATTT				
Consensus	GCCTGACGATTCCTCTGAAATATTTTGTATTTTAAAGAGATATA	TATGAAAGATTTCTA	TTGATTTATTT				
RET43-EMPI	TTTCCGCTTTTCTCACTTCCTCTGAGCGGAAAAGCTTACCACTTGGAAAAATCCGCTTATCCAAAG						
EcotIn-MPI	TTTCCGCTTTTCTCACTTCCTCTGAGCGGAAAAGCTTACCACTTGGAAAAATCCGCTTATCCAAAG						
Consensus	TTTCCGCTTTTCTCACTTCCTCTGAGCGGAAAAGCTTACCACTTGGAAAAATCCGCTTATCCAAAG						
RET43-EMPI	TTTCCGCTTTTCTCACTTCCTCTGAGCGGAAAAGCTTACCACTTGGAAAAATCCGCTTATCCAAAG						
EcotIn-MPI	TTTCCGCTTTTCTCACTTCCTCTGAGCGGAAAAGCTTACCACTTGGAAAAATCCGCTTATCCAAAG						
Consensus	TTTCCGCTTTTCTCACTTCCTCTGAGCGGAAAAGCTTACCACTTGGAAAAATCCGCTTATCCAAAG						

Hình 6. Kết quả giải trình tự pET43EMPI và kiểm tra sự đồng khung của gen mã hóa ecotin-MPI

Như vậy, chúng tôi đã tạo dòng thành công gen mã hóa ecotin-MPI vào plasmid biểu hiện pET43.1a cho phép biểu hiện MPI dung hợp với ecotin dạng tan trong chu chất.

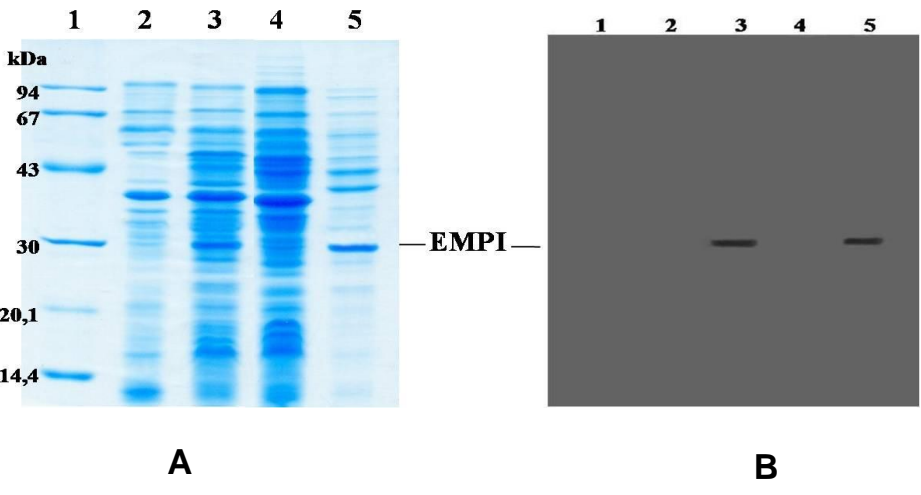
3.2 Biểu hiện ecotin-mpi dạng tan trong chu chất E. coli B834(DE3)/pET43EMPI

Để đánh giá khả năng tạo protein tái tổ hợp ecotin-MPI trong chu chất của chủng E. coli B834(DE3)/pET43EMPI, mẫu sinh khối sau cảm ứng được thu nhận và tiến hành ly trích lấy phân đoạn protein trong chu chất bằng phương pháp shock thẩm thấu. Đồng thời tiến hành thu mẫu protein tổng số và phân đoạn tế bào chất. Các kết quả thu nhận được phân tích kiểm tra bằng SDS-PAGE và khẳng định bằng phương pháp Western blot.

Kết quả phân tích SDS-PAGE cho thấy phân đoạn chu chất của chủng E. coli B834(DE3)/pET43EMPI được cảm ứng bằng IPTG xuất hiện rõ nét một vạch protein ecotin-MPI có kích thước khoảng 30kDa (Hình 7 A, giếng 5).

Khi thực hiện lai Western blot với kháng thể kháng thể kháng insulin HUI-18 cũng thu được kết quả dương tính trên bản phim tương ứng với vị trí protein cần khẳng định trên gel SDS-PAGE. Như vậy, protein tái tổ hợp ecotin-MPI đã được biểu hiện thành công ở dạng tan trong chu chất của E. coli như mong đợi.

Bên cạnh đó, protein ecotin-MPI hầu như không được tìm thấy trong phân đoạn tế bào chất khi sử dụng phương pháp shock thẩm thấu để thu nhận phân đoạn chu chất. Kết quả này cho thấy dòng tế bào E. coli B834(DE3) mang plasmid pET43EMPI có khả năng biểu hiện ecotin-MPI một cách vượt mức trong phân đoạn chu chất. Do đó, có thể khẳng định ecotin đã đưa và biểu hiện protein dung hợp với nó, ecotin-MPI vào trong chu chất một cách triệt để.



Hình 7. Kết quả khảo sát sự biểu hiện của MPI dung hợp ecotin trong chu chất. (A) Điện di SDS-PAGE; (B) Lai Western-Blot với kháng thể kháng Insulin HUI18. 1, Thang phân tử lượng protein; 2, B834(DE3)/pET43EMPI không cảm ứng IPTG; 3, B834(DE3)/pET43EMPI được cảm ứng IPTG; 4, Protein ở phân đoạn tế bào chất; 5, Protein ở phân đoạn chu chất.

4. KẾT LUẬN

Đã thiết lập được plasmid biểu hiện pET43EMPI dựa trên sự dung hợp gen mã hóa ecotin từ *E. coli*, trình tự *linker* mã hóa peptide chứa trình tự nhận biết của TEV protease và gen mã hóa 6xHis-MPI cũng như tạo dòng thành công chủng *E. coli* B834(DE3) mang plasmid tái tổ hợp pET43EMPI có khả năng biểu hiện MPI dung hợp với ecotin tiết trong chu chất.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện trong khuôn khổ đề tài cấp nhà nước “Nghiên cứu điều trị bệnh ĐTD bằng công nghệ gene ở vi khuẩn *E. coli*”. Các thí nghiệm được tiến hành có sự dụng trang thiết bị của Phòng Thí nghiệm Sinh học Phân tử, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Tp.HCM.

5. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gleslie R.D., 1994. *Y học thường thức bệnh đái tháo đường*. Nhà xuất bản Thành phố Hồ Chí Minh, 200 trang.
2. Ajamaluddin Malik, Marco Jenzsch, Andreas Lubbert, Rainer Rudolph, (2007). Periplasmic production of native human proinsulin as a fusion to *Escherichia coli* ecotin. *Protein expression and purification* 55: 100-111.
3. A.Mc. Cormack, A. McElduff, (2004). An update on insulin therapy. *Pharmacist* 23: 521-526.
4. Nilsson J, Staahl S, Lundeberg J, Uhlen M, & Nygren PA, (1997). Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins. *Protein expression and purification* 11 (1): 1-16
5. W. Kemmler, J.D. Peterson, D.F. Steiner, (1971). Studies on the conversion of proinsulin to insulin. *Journal of Biological Chemistry* 246: 6786-6791
6. Winter J., Neubauer P., Lockshuber R.G., Rudolph R., (2000). Increased production of human proinsulin in the periplasmic space of *Escherichia coli* by fusion to dsbA. *Journal of Biotechnology* 84: 175-185.
7. Zhang Y., Olsen R.D., Nguyen B.K.Y., Olson P.S., Rhodes T.E., Mascarenhas D., (1998). Expression of Eukaryotic proteins in soluble form in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification* 12: 159-165.