

Tạo dòng, biểu hiện và tinh sạch protein hGM-CSF (Human Granulocyte - Macrophage Colony - Stimulating Factor) trong chu chất tế bào *Escherichia coli*

- Nguyễn Phú Sang
- Nguyễn Thanh Thảo
- Trần Văn Hiếu

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG - HCM

(Bài nhận ngày 30 tháng 10 năm 2014, nhận đăng ngày 26 tháng 01 năm 2015)

TÓM TẮT

hGM-CSF là một cytokine bao gồm 127 amino acid, với 4 vị trí cystein hình thành 2 cầu nối disulfide. Mặc dù dạng tự nhiên của *hGM-CSF* là glycoprotein nhưng sự glycosyl hóa không có ảnh hưởng đến chức năng sinh học của protein này. *GM-CSF* có chức năng kích thích sự tồn tại, tăng sinh, biệt hóa của các tế bào tiền thân tạo máu và tăng cường chức năng của các tế bào máu trưởng thành. *GM-CSF* đã được sử dụng rộng rãi để điều trị nhiều loại bệnh như: chứng suy giảm bạch cầu trung tính do hóa trị ung thư, sử dụng trong cấy ghép tủy xương, bệnh suy giảm bạch cầu tủy cấp... Trong nghiên cứu này chúng tôi trình bày kết quả tạo dòng và biểu hiện protein *hGM-CSF* trong chu chất tế bào *Escherichia coli*. Gen mã hóa cho *GM-CSF* người được nhân bản bằng phương pháp PCR với cặp mồi có mang trình tự cắt giới hạn của *NcoI* và *XhoI*. Đoạn DNA khuếch đại được dòng hóa thành công vào vị trí *NcoI/XhoI* trên vector *pET-*

22b và được chèn đồng khung với trình tự tín hiệu tiết *pelB*. Vector biểu hiện *pET-hGM* được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21(DE3) và thể biến nạp được cảm ứng IPTG để kiểm tra khả năng biểu hiện protein *hGM-CSF*. Phân đoạn protein chu chất được thu nhận bằng phương pháp sốc thẩm thấu. Sự biểu hiện của *hGM-CSF* được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE các phân đoạn protein tổng, tế bào chất và chu chất. Protein trong phân đoạn chu chất sau đó được tinh chế bằng sắc ký trao đổi anion sử dụng cột Q Sepharose FF với phương pháp dung ly tăng nồng độ muối. Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy có sự hiện diện vạch protein tương đương với *hGM-CSF* ở pha chu chất của chủng *E. coli* BL21(DE3)/*pET-hGM* và protein thu nhận được qua bước sắc ký đạt độ tinh sạch 97,4 %. Kết quả biểu hiện và tinh sạch trên đã được khẳng định bằng phương pháp Western Blot với kháng thể đặc hiệu kháng *hGM-CSF*.

Từ khóa: *GM-CSF*, chu chất, sắc ký trao đổi anion

MỞ ĐẦU

Nhân tố kích thích tạo khóm bạch cầu hạt-đại thực bào ở người – hGM-CSF (human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) – là một cytokin có bản chất là glycoprotein, gồm 127 amino acid có trọng lượng phân tử từ 14 đến 35 kDa tùy theo tình trạng đường hóa. GM-CSF có hai vị trí N-glycosyl hóa và bốn vị trí O-glycosyl hóa, tuy nhiên sự glycosyl hóa không ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của protein này [1]. GM-CSF có hai cầu nối disulfide nội phân tử hình thành giữa các gốc Cys54 và Cys96, Cys88 và Cys121. Cầu nối disulfide thứ nhất (54-96) liên quan đến hoạt tính sinh học của GM-CSF trong khi cầu nối disulfide còn lại không có ảnh hưởng tới hoạt tính [2]. GM-CSF người tái tổ hợp đã được sử dụng rộng rãi để điều trị các bệnh như suy giảm bạch cầu trung tính, bệnh bạch cầu tủy cấp, sử dụng trong cấy ghép tế bào gốc tạo máu hay làm tá dược vắc-xin. Cho đến nay, cytokin này còn được chỉ định cho các bệnh nhân bị suy giảm miễn dịch, AIDS hay bị nhiễm trùng...[3, 4]. Như vậy, với tiềm năng ứng dụng cộng thêm nhu cầu sử dụng ngày một nhiều, hGM-CSF là một trong những protein tái tổ hợp đang được quan tâm nghiên cứu và sản xuất hiện nay. Trong các hệ thống được sử dụng để biểu hiện protein tái tổ hợp thì *E. coli* là một hệ thống được sử dụng khá phổ biến. Protein tái tổ hợp có thể được biểu hiện ở các dạng khác nhau và trong các không gian khác nhau ở tế bào *E. coli*. Ở đây chúng tôi lựa chọn tiết vào chu chất vì nó có những ưu điểm phù hợp với protein mục tiêu như sản phẩm tạo thành thường ở dạng tan và không chứa methionine đầu N, vùng chu chất tạo môi trường thuận lợi cho việc hình thành cầu nối disulfide [5, 6].

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các kết quả đồng hóa và biểu hiện hGM-CSF trong chu chất tế bào *E. coli* như là bước nền tảng ban đầu trong quy trình nghiên cứu nhằm sản xuất ra protein này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật và plasmid

Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α [*F- endA1 hsdR17 (rk-/mk-) supE44 thi λ recA1 gyrA96 Δ lacU169 (ϕ 80 lacZ Δ M15)] (Takara) được sử dụng để tạo dòng và lưu trữ plasmid. *E. coli* BL21(DE3) [*F-, ompT, hsdS (r_B- m_B), gal (DE3)*] được sử dụng làm chủng chủ để biểu hiện protein mục tiêu.*

Plasmid pET-22b (Novagen), kích thước 5493 bp chứa promoter T7 được cảm ứng bằng IPTG (isopropyl β -D thiogalactoside), gen kháng ampicillin (Amp) được dùng để tạo plasmid pET-hGM biểu hiện hGM-CSF. Plasmid pET-22b còn có một trình tự tiết *pelB* ở đầu N, khi gen mục tiêu được chèn đồng khung với trình tự này, protein được tạo thành sẽ được tiết vào vùng chu chất tế bào *E. coli*.

Tách chiết plasmid

Các plasmid được tách chiết theo phương pháp SDS-kiềm theo mô tả của Sambrook và Russell [7].

Thiết kế plasmid tái tổ hợp pET-hGM mang gen *hgm-csf* mã hóa cho protein hGM-CSF

Gen *hgm-csf* mã hóa cho protein hGM-CSF được thu nhận từ plasmid pGM-CSF (cung cấp bởi BM. Công nghệ Sinh học Phân tử - Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP HCM) bằng cách PCR với hai môi 5'-Nco và 3'-Xho theo chương trình 95 °C/5 phút; 30 chu kỳ: 94 °C/45 phút, 55 °C/45 giây, 72 °C/45 phút; kết thúc, 72 °C/10 phút. Hai môi này sẽ bắt cặp vào khuôn và nhân bản đoạn trình tự *hgm-csf*. Sản phẩm tạo ra là đoạn gen có kích thước khoảng 415 bp cùng với vị trí cắt giới hạn của enzyme *XhoI* và *NcoI* ở hai đầu. Sản phẩm PCR được xử lý tạo đầu dính với hai enzyme cắt giới hạn trên và tinh chế bằng EZ-10 Spin Column DNA Gel. Extraction kit (BioBasic, Canada) theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Plasmid pET-22b cũng được cắt mở vòng bằng cặp enzyme *XhoI* và *NcoI*, bất hoạt enzyme bằng phenol/chloroform và tinh chế bằng EZ-10 Spin Column PCR Products Purification kit (BioBasic, Canada). Kích thước của đoạn DNA mang gen *hgm-csf* và plasmid pET-22b đã cắt mở vòng được xác định bằng điện di trên gel agarose 1 %.

Plasmid pET-hGM được cấu trúc bằng cách nối gen *hgm-csf* đã xử lý với *XhoI* và *NcoI* vào plasmid pET-22b cũng được xử lý với hai enzyme này.

Tạo tế bào khả nạp và biến nạp plasmid pET-hGM vào tế bào *E. coli*DH5a

Tạo tế bào *E. coli* khả nạp bằng phương pháp calcium lạnh và pET-hGM được biến nạp vào *E. coli* DH5a bằng phương pháp sốc nhiệt theo mô tả của Sambrook và Russell [7]. 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 µg/mL (LBA-Amp100), ủ 37 °C, 14 - 16 giờ.

Sàng lọc thể biến nạp và kiểm tra bằng enzyme cắt giới hạn và PCR plasmid

Các thể biến nạp DH5a mọc được trên môi trường LBA-Amp tiếp tục được sàng lọc sơ bộ bằng phương pháp PCR khuẩn lạc với cặp mồi 5'-Nco và 3'-Xho. Thu nhận thể biến nạp cho kết quả PCR dương tính và tách chiết plasmid. Sau đó tiến hành kiểm tra plasmid bằng phương pháp PCR với cặp mồi bất cặp trên plasmid T7pro/T7ter (Novagen) và cắt giới hạn với hai enzyme *XhoI* và *NcoI*.

Plasmid tái tổ hợp pET-hGM thu nhận sau các quá trình kiểm tra được tiến hành giải trình tự theo phương pháp Sanger cải tiến bởi công ty Macrogen (Hàn Quốc).

Kết quả giải trình tự được phân tích và so sánh bằng phần mềm Jellyfish (Lab Valocity).

Biểu hiện protein hGM-CSF

Plasmid pET-hGM được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21(DE3) khả nạp. Chủng *E. coli* tái tổ hợp được cảm ứng biểu hiện hGM-CSF bằng nuôi cấy lắc trong môi trường LB, bổ sung ampicillin 100 µg/mL ở 37 °C, tốc độ lắc 250 rpm. Khi OD₆₀₀ đạt 0,8; bổ sung IPTG đến nồng độ cuối là 0,5 mM; tiếp tục nuôi lắc ở 30 °C trong 16 h. Tách các phân đoạn protein bằng phương pháp sốc thẩm thấu theo mô tả của Ausubel và cộng sự [8].

Phân tích SDS-PAGE và lai Western

Các phân đoạn protein tổng, tế bào chết, chu chất thu được sẽ được điện di trên gel polyacrylamide 12,5 % có sự hiện diện của SDS và so sánh kích thước với thang protein chuẩn. Protein sau khi điện di được chuyển lên màng lai và thực hiện lai Western blot với kháng thể chuột đơn dòng kháng hGM-CSF và phát hiện nhờ kháng thể kháng IgG của chuột cộng hợp với horseradish peroxidase HRP. Hiện phim bằng bộ Kit ECL (Amersham).

Tinh sạch protein hGM-CSF bằng sắc ký trao đổi anion

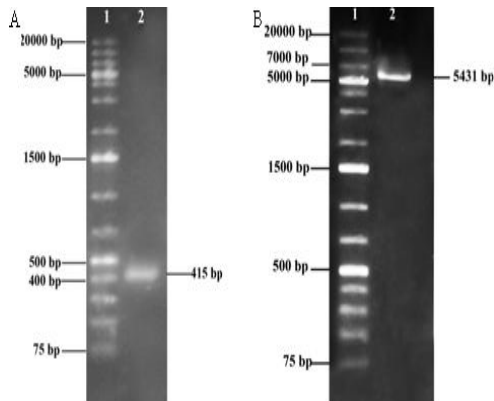
Do hGM-CSF có pI = 5,5 ở pH = 7,5 protein tái tổ hợp hGM-CSF tích điện âm nên phương pháp sắc ký trao đổi anion được sử dụng để tinh chế. Dung dịch cân bằng (ddA): NaCl 20 mM-tris 50 mM, pH 7,5. Dung dịch dung ly (ddB): Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0,1 M, NaCl 1 M, pH 7,5. Hệ thống tinh chế AKTA FPLC được cân bằng bằng nước. Cột tinh chế anion Q SP FF 5 ml (GE Healthcare) được rửa bằng nước, cân bằng bằng dung dịch A. Mẫu được nạp vào cột với tốc độ dòng 2 ml/phút, tái cân bằng cột bằng dung dịch A. Dung ly theo bậc thang với tốc độ dòng 2 mL/phút, 20 % dung dịch B và 80 % dung dịch A tương tự với 100 % B. Thu nhận phân đoạn protein tương ứng với 20 % và 100 % dung dịch B. Phân tích kết quả bằng điện di SDS-PAGE và lai với kháng thể đặc hiệu kháng hGM-CSF.

KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

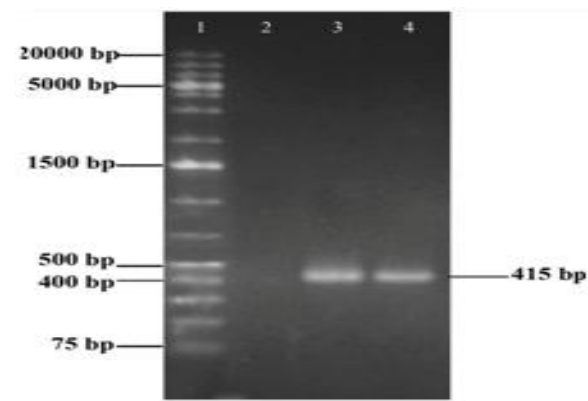
Tạo vector tái tổ hợp pET-hGM mang gen *hgm-csf*

Gen *hgm-csf* được thu nhận bằng phương pháp PCR từ plasmid pGM-CSF cho sản phẩm có kích thước 415bp tương ứng với kích thước dự kiến (Hình 1A). Sản phẩm PCR sau đó được xử

lý tạo đầu dính bằng cặp enzyme *XhoI* và *NcoI*. Sản phẩm khuếch đại gen *hgm-csf* / *XhoI* và *NcoI* được tinh chế và nối vào plasmid pET-22b đã cắt mở vòng với cùng cặp enzyme *XhoI* và *NcoI* (Hình 1B). Hỗn hợp sản phẩm nối được biến nạp vào *E. coli* DH5 α và sàng lọc bằng môi trường LBA-Amp.



Hình 1. Thu nhận gen *hgm-csf* và plasmid pET-22b. A, Kết quả thu nhận gen *hgm-csf* từ plasmid pGM-CSF. 1, Thang chuẩn DNA 1kb plus; 2, Sản phẩm PCR thu nhận gen *hgm-csf* từ plasmid pGM-CSF. B, Kết quả kiểm tra plasmid pET-22b. 1, Thang chuẩn DNA 1kb plus; 2, Plasmid thu nhận được cắt bằng enzyme *XhoI* và *NcoI*

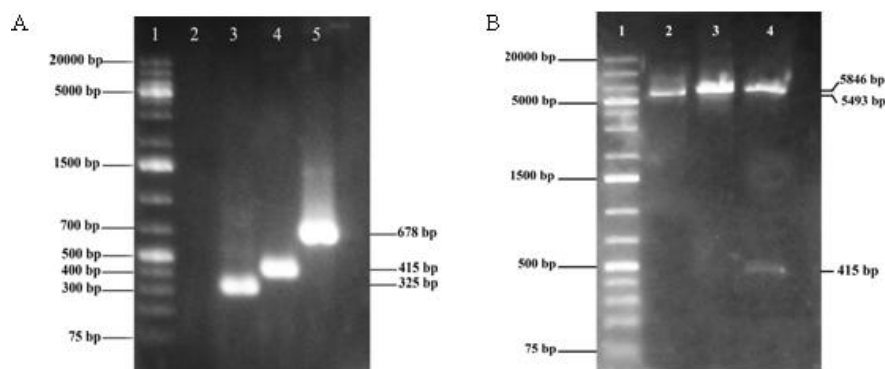


Hình 2. Kết quả PCR khuẩn lạc dự tuyển. 1, Thang chuẩn DNA 1kb plus; 2, Sản phẩm PCR khuẩn lạc *E. coli* DH5 α (đối chứng âm); 3, Sản phẩm PCR với khuôn DNA là plasmid pGM-CSF (đối chứng dương); 4, Sản phẩm PCR khuẩn lạc dự tuyển

Thế biến nạp mọc được trên môi trường này được sàng lọc sơ bộ bằng phương pháp PCR khuẩn lạc với cặp mồi 5'-*NcoI*/3'-*XhoI*. Kết quả điện di kiểm tra trên gel agarose 1% trên Hình 2 cho thấy sản phẩm khuếch đại là một vạch có kích thước 415 bp tương ứng với kích thước gen *hgm-csf*.

Khuẩn lạc này được tách plasmid, tiếp tục kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng phương pháp PCR plasmid và cắt giới hạn. Ở Hình 3A, giếng 5, sản phẩm PCR plasmid pET-hGM với cặp mồi 5'-*NcoI*/3'-*XhoI* cho thấy xuất hiện một vạch có kích thước khoảng 415 bp, tương ứng với kích thước gen *hgm-csf*. Như vậy, trong plasmid tái tổ hợp dòng hóa được có sự hiện diện của gen *hgm-csf*. Phản ứng PCR với cặp mồi bất cặp trên

plasmid T7pro/T7ter cho sản phẩm có kích thước 678 bp (Hình 3A, giếng 5), bằng kích thước đoạn DNA mang gen *hgm-csf* giữa hai mồi. Plasmid tái tổ hợp sau khi được kiểm tra bằng phương pháp PCR, được tiếp tục kiểm tra bằng phương pháp cắt giới hạn. Ở Hình 3B giếng 2 và giếng 3 tương ứng với plasmid pET-22b không mang gen và plasmid tái tổ hợp pET-hGM được cắt mở vòng bằng *XbaI*. Hình ảnh trên bản điện di cho thấy có sự chênh lệch kích thước giữa hai plasmid này. Bên cạnh đó, plasmid này khi được xử lý với cặp enzyme *NcoI* và *XhoI* cho hai vạch tương ứng với kích thước plasmid pET22b (5493bp) và gen *hgm-csf* (415bp) nối vào (Hình 3B, giếng 4). Như vậy, có thể gen *hgm-csf* đã được chèn vào plasmid pET-22b.



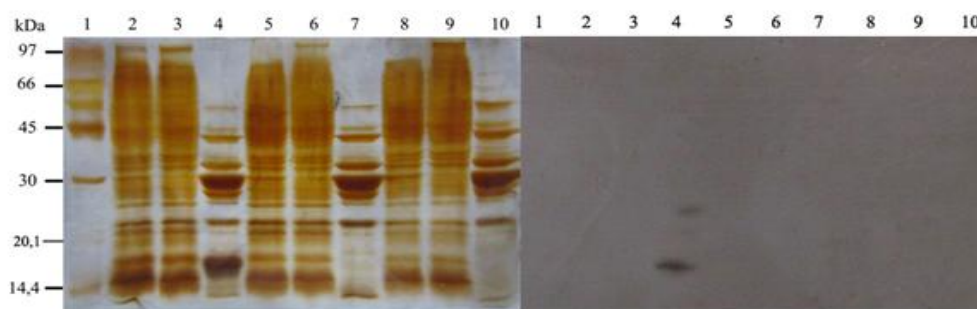
Hình 3. Kết quả kiểm tra plasmid bằng PCR và cắt giới hạn. A, Kết quả kiểm tra plasmid bằng PCR. 1, Thang chuẩn DNA 1kb plus; 2, Sản phẩm PCR plasmid pET-22b với cặp mồi 5'-Nco/3'-Xho; 3, Sản phẩm PCR plasmid pET-22b với cặp mồi T7-pro/T7-ter; 4, Sản phẩm PCR plasmid tái tổ hợp pET-hGM với cặp mồi 5'-Nco/3'-Xho; 5, Sản phẩm PCR plasmid tái tổ hợp pET-hGM với cặp mồi T7-pro/T7-ter. B, Kết quả kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng enzyme cắt giới hạn. 1, Thang chuẩn DNA 1kb plus; 2, Plasmid pET-22b cắt bằng XbaI; 3, Plasmid pET-hGM cắt bằng XbaI; 4, Plasmid pET-hGM cắt bằng XhoI và NcoI

Plasmid sau khi được kiểm tra bằng phương pháp PCR và cắt giới hạn được xác định độ chính xác về mặt trình tự bằng cách giải trình tự và so sánh với trình tự lý thuyết bằng phần mềm Jellyfish. Kết quả cho thấy có sự đồng khung dịch mã với trình tự tín hiệu *pelB* và tương đồng 100 % so với trình tự gen đã thiết kế dựa trên ngân hàng gen (kết quả không trình bày).

Qua các 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 pET-hGM, plasmid này được biến nạp vào *E. coli* BL21(DE3) để tạo chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET-hGM biểu hiện GM-CSF người tái tổ hợp.

Biểu hiện protein hGM-CSF trong chu chất tế bào *E. coli* BL21(DE3)/pET-hGM

Để cảm ứng sự biểu hiện của gen *hgm-csf* trong tế bào *E. coli* BL21(DE3), chúng tôi tiến hành nuôi cấy dòng tế bào này trong môi trường LB lỏng có bổ sung ampicillin nồng độ cuối 100 μ g/mL và cảm ứng IPTG với nồng độ 0,5 mM. Sau khi cảm ứng từ 16-18 h ở nhiệt độ 30 $^{\circ}$ C, chúng tôi tiến hành thu sinh khối tế bào. Thực hiện tách các phân đoạn protein bằng phương pháp sốc thẩm thấu theo mô tả của Ausubel và cộng sự. Sau đó sử dụng phương pháp SDS-PAGE để phân tích protein thu được trong các phân đoạn.



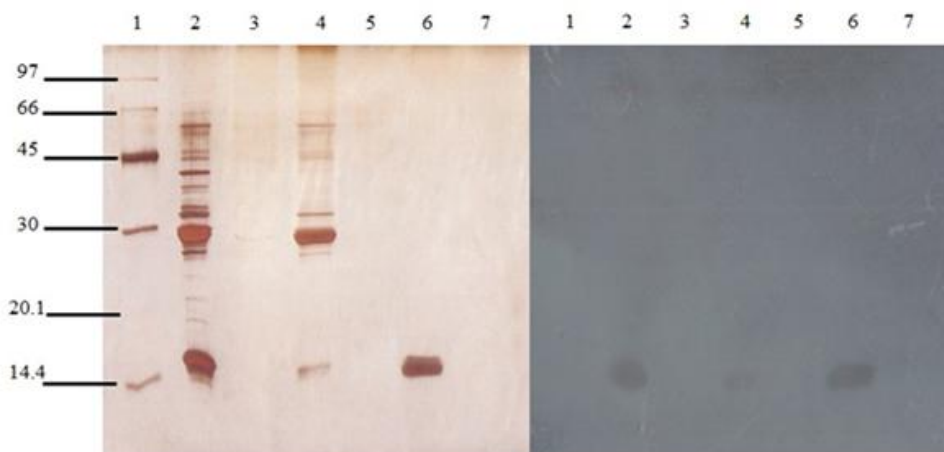
Hình 4. Sự biểu hiện hGM-CSF trong *E. coli* BL21(DE3)/pET-hGM. A, SDS-PAGE; B, Western Blot với kháng thể đặc hiệu kháng hGM-CSF; 1, Thang phân tử lượng thấp; 2, 3, 4: *E. coli* BL21(DE3)/pET-hGM cảm ứng bằng IPTG (phân đoạn protein tổng, tế bào chất, chu chất); 5, 6, 7 *E. coli* BL21(DE3)/pET-hGM (phân đoạn protein tổng, tế bào chất, chu chất); 8, 9, 10 *E. coli* BL21(DE3) cảm ứng bằng IPTG (phân đoạn protein tổng, tế bào chất, chu chất)

Trên Hình 4A, các giếng 5, 6, 7, 8, 9, 10 là các nghiệm thức đối chứng. Để kiểm tra sự biểu hiện của protein hGM-CSF sau khi cảm ứng, so sánh các vạch của protein với các nghiệm thức đối chứng. Trên bản điện di, các giếng 2, 3, 4 là mẫu các phân đoạn protein tương ứng với phân đoạn protein tổng số, tế bào chết, chu chất của chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET-hGM có cảm ứng IPTG, chúng tôi nhận thấy ở mẫu phân đoạn chu chất có sự xuất hiện một vạch protein nằm giữa vạch 14,4 kDa và 20,1 kDa của thang phân tử lượng, tương ứng với kích thước của protein hGM-CSF lý thuyết (giếng 4). Trong khi mẫu protein trong các phân đoạn chu chất ở nghiệm thức đối chứng (giếng 7, 10) không nhận thấy sự xuất hiện của vạch protein này. Như vậy, chúng tôi dự đoán, đã biểu hiện được protein hGM-CSF trong chu chất tế bào *E. coli* BL21(DE3)/pET-hGM. Để khẳng định kết quả này chúng tôi tiếp tục thực hiện phương pháp Western Blot với

kháng thể đặc hiệu kháng hGM-CSF. Trên bản phim xuất hiện vạch tín hiệu tương ứng với vị trí của vạch protein xuất hiện trong phân đoạn chu chất khi được cảm ứng IPTG (Hình 4B, giếng 4), kết quả này khẳng định vạch protein đậm xuất hiện khi được cảm ứng chính là GM-CSF. Từ những kết quả trên chúng tôi kết luận đã biểu hiện thành công protein hGM-CSF trong chu chất tế bào *E. coli* BL21(DE3)/pET-hGM.

Tinh sạch hGM-CSF trong chu chất tế bào *E. coli* BL21(DE3)/pET-hGM bằng sắc ký trao đổi anion

Do protein hGM-CSF có pI ở khoảng 5,5 là một protein chứa nhiều nhóm mang điện tích, tích điện âm trong điều kiện pH sinh lý (6-8). Vì thế chúng tôi thực hiện khảo sát tinh sạch protein này bằng sắc ký trao đổi anion, dung ly bằng cách thay đổi nồng độ muối hay pH và cuối cùng đánh giá mức độ tinh sạch.



Hình 5. Kết quả tinh sạch hGM-CSF bằng phương pháp sắc ký trao đổi anion (cột Q Sepharose FF), dung ly bằng tăng nồng độ muối. A, SDS-PAGE; B, Western Blot với kháng thể đặc hiệu kháng hGM-CSF. 1. Thang protein phân tử lượng thấp; 2. Mẫu chu chất; 3. Phân đoạn sau khi qua cột; 4. Phân đoạn tái cân bằng cột; 5. Phân đoạn rửa 5 % ddB; 6. Phân đoạn dung ly 20 % ddB; 7. Phân đoạn dung ly 100 % ddB.

Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy ở các giếng 2, 3, 4, 5 là mẫu các phân đoạn protein tương ứng với phân đoạn protein tổng số từ chu chất, phân đoạn protein sau khi qua cột, phân đoạn tái cân bằng cột và phân đoạn rửa, chúng tôi nhận thấy ở mẫu phân đoạn chu chất có sự xuất hiện một vạch protein nằm giữa vạch 14,4 kDa và

20,1 kDa của thang phân tử lượng, tương ứng với kích thước của protein hGM-CSF lý thuyết. Ở pH dung dịch cân bằng (pH,5) sự bám của hGM-CSF vào chất trao đổi anion ở cột Q Sepharose FF gần như diễn ra hoàn toàn do không có sự xuất hiện của protein này trong phân đoạn dung dịch sau khi qua cột (Hình 5A, giếng 3), mặc dù có sự rửa

trôi một phần hGM-CSF ở giai đoạn tái cân bằng cột (Hình 5A, giếng 4). Ở phân đoạn dung ly với 20 % ddB, chúng tôi thấy có sự xuất hiện một vạch protein đậm, có kích thước tương ứng với kích thước dự đoán của hGM-CSF và toàn bộ protein có thể được dung ly tại phân đoạn này (giếng 6) và không cần tới nồng độ muối cao hơn (Hình 5A, giếng 7). Để khẳng định các protein tinh sạch được chính là hGM-CSF, chúng tôi tiến hành lai với kháng thể đặc hiệu cho hGM-CSF. Kết quả lai trình bày trong Hình 5B cho thấy các protein chúng tôi thu được qua quá trình tinh sạch bằng sắc ký trao đổi anion chính là protein mục tiêu hGM-CSF. Ngoài ra, mức độ tinh sạch của protein thu nhận được đánh giá bằng phần mềm xác định đậm độ và kết quả cho thấy độ tinh sạch của hGM-CSF thu được sau quá trình sắc ký trao đổi anion là 97,4 % (kết quả không trình bày).

Thử nghiệm tương tự với phương pháp dung ly bằng pH, kết quả cho thấy bằng cách giảm pH không cho phép chúng tôi thu được protein hGM-CSF tinh sạch (kết quả không trình bày ở đây). Như vậy, từ những kết quả trên chúng tôi kết luận

đã tinh sạch thành công protein hGM-CSF trong chu chất tế bào *E. coli* BL21(DE3)/pET-hGM bằng sắc ký trao đổi anion sử dụng cột Q Sepharose FF với phương pháp dung ly tăng nồng độ muối.

KẾT LUẬN

Như vậy, chúng tôi đã tạo dòng thành công dòng tế bào *E. coli* BL21(DE3) có mang vector tái tổ hợp pET-hGM. Dòng này có khả năng biểu hiện protein hGM-CSF trong chu chất tế bào *E. coli*. Sự biểu hiện hGM-CSF đã được kiểm chứng bằng phương pháp SDS-PAGE và khẳng định lại bằng phương pháp Western blot. Protein này được tiến hành tinh sạch bằng sắc ký trao đổi anion sử dụng cột Q Sepharose FF với phương pháp dung ly tăng nồng độ muối. Mức độ tinh sạch của protein được xác định bằng phần mềm định đậm độ với kết quả đạt 97,4 %. Chúng này có thể được sử dụng làm giống để cung cấp nguồn nguyên liệu hGM-CSF cho quy trình sản xuất hGM-CSF tái tổ hợp ứng dụng trong y học ở Việt Nam.

Cloning, periplasmic expression and purification of hGM-CSF (Human Granulocyte - Macrophage Colony-Stimulating Factor) in *Escherichia coli*

- **Phu Sang Nguyen**
- **Thanh Thao Nguyen**
- **Hieu Tran Van**
University of Science, VNU-HCM

SUMMARY

Human GM-CSF is a cytokine consisting of 127 amino acid residues, with four cysteines being involved in two disulfide bonds. Although GM-CSF is glycosylated in

its natural form, the glycosylation perhaps has not been involved in its biological function. GM-CSF stimulates the survival, proliferation, and differentiation of hem at

opoietic progenitor cells and also enhances the functional properties of mature myeloid cells. GM-CSF is used as a therapeutic agent in various clinical cases such as neutropenia following chemotherapy, bone marrow transplantation, acute myeloid leukemia... In this study, we report the results on the cloning and expression of recombinant human GM-CSF in the periplasmic space of *Escherichia coli*. The hGM-CSF gene was amplified by polymerase chain reaction using two oligonucleotide primers containing *Nco*I and *Xho*I restriction sites. This DNA fragment was successfully cloned between the *Nco*I and *Xho*I sites of the plasmid pET-22b, in frame with the *pelB* signal peptide sequence. The expression vector pET-hGM was transformed into *E. coli* BL21(DE3) and the

Keywords: hGM-CSF, periplasmic, anion exchange chromatography.

transformants were induced by IPTG and examined for hGM-CSF production. Periplasmic proteins were released by osmotic shock treatment. The expression of recombinant hGM-CSF was evaluated by SDS-PAGE in total, cytoplasmic and periplasmic fractions. The recombinant hGM-CSF in periplasmic fraction was then subjected to ion exchange chromatography using Q Sepharose FF column with salt-increment elution step. SDS-PAGE showed there was a visible expression of recombinant hGM-CSF in the periplasmic fraction of the *E. coli* BL21(DE3)/pET-hGM and a purified band with the purity of 97.4% after ion exchange chromatography. This result was further confirmed by Western blot using anti-hGM-CSF antibody.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [8]. G. Marini, et al., Recombinant human granulocyte - macrophage colony-stimulating factor: effect of glycosylation on pharmacokinetic parameters. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10, 271-278, (2007).
- [2]. M.R. Walter, et al., Three-dimensional structure of recombinant human granulocyte - macrophage colony-stimulating factor. *J Mol Biol*, 224, 4 1075-85 (1992).
- [3]. J.O. Armitage, Emerging applications of recombinant human granulocyte -macrophage colony - stimulating factor. *Blood*, 92(12), 4491-4508 (1998).
- [4]. P.K.B. Ghosh, D. Karnik, Human granulocyte - macrophage colony stimulating factor: The protein and its current & emerging applications, *Indian Journal of Biotechnology*, 6, 435-448 (2007).
- [5]. J. Messens, J.F. Collet, Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Int J Biochem Cell Biol*, 38, 7, 1050-62 (2006).
- [6]. R. Greenberg, et al., Expression of biologically active, mature human granulocyte - macrophage colony stimulating factor with an *E. coli* secretory expression system. *Curr Microbiol*, 17, 6, 321-332 (1988).
- [7]. J. Sambrook, D.W.R., Molecular Cloning: A laboratory manual, third edition. Cold Spring Harbor laboratory (2001).
- [8]. F.M. Ausubel, Brent, R. Kingston, R. E. Moore, D. D. Seidman, J. G. Smith, J. A. & K. Struhl, Current protocols in Molecular Biology, New York: Wiley (1989).