

CẤU TRÚC CHŨNG NẤM MEN *PICHIA PASTORIS* BIỂU HIỆN MINI-PROINSULIN DẠNG TIẾT RA MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY

Ngô Thị Kim Hằng, Võ Minh Trí, Trần Linh Thuớc

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 21 tháng 03 năm 2011, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 09 tháng 04 năm 2012)

TÓM TẮT: Đái tháo đường là một trong những căn bệnh đang rất được quan tâm hiện nay. Nhằm mục đích sản xuất insulin tái tổ hợp phục vụ điều trị bệnh đái tháo đường, chúng tôi đồng hóa và biểu hiện miniproinsulin trong *Pichia pastoris*. Đoạn DNA mang gen mã hóa miniproinsulin-6xHis (MPI-6xHis) được đồng hóa vào vector pPICZαA tạo plasmid pPICZαA/h-mpi để cấu trúc chủng *P. pastoris* GS115::h-mpi biểu hiện MPI tái tổ hợp dạng tiết ra ngoài môi trường. Kiểu hình và kiểu gen của *P. pastoris* GS115::h-mpi được xác định bằng PCR và cắt hạn chế. MPI được biểu hiện ở dạng dung hợp với thể 6xHis khi cảm ứng với methanol với nồng độ cuối cùng 0,5% sau 96 giờ.

Từ khóa: biểu hiện gen, *Pichia pastoris*, mini-proinsulin.

MỞ ĐẦU

Đái tháo đường (ĐTĐ) là một trong những căn bệnh đang được quan tâm hàng đầu hiện nay. Bệnh ĐTĐ, chiếm khoảng 60-70% trong các bệnh nội tiết, là nguyên nhân gây tử vong đứng hàng thứ năm ở các nước phát triển và đang tăng đột biến ở nhiều nước đang phát triển, các nước công nghiệp mới. Hàng năm trên thế giới có khoảng 3,2 triệu người chết vì bệnh ĐTĐ [4]. Ngày nay, việc sử dụng insulin được xem là một phần không thể thiếu đối với bệnh nhân mắc bệnh ĐTĐ, đặc biệt là ĐTĐ týp 1 [6]. Vì thế, việc sản xuất insulin người bằng con đường protein tái tổ hợp đã và đang là giải pháp hiệu quả nhất hiện nay.

Phương pháp sản xuất insulin người tái tổ hợp dựa trên một chuỗi protein (proinsulin) thay vì 2 chuỗi đã được khẳng định ưu thế về kỹ thuật và hiệu quả thu nhận insulin có hoạt

tính. Gần đây, mô hình mini-proinsulin (MPI) đã được nghiên cứu với nhiều ưu điểm. Mini-proinsulin có cấu trúc tương tự với proinsulin, chỉ khác là có cải tiến thay thế đoạn peptide đầu carboxyl (đầu C) tự nhiên 31 amino acid trong proinsulin bằng một đoạn peptide ngắn hơn (9 amino acid), giúp dễ dàng cho việc tinh chế và gia tăng hiệu quả gấp cuộn dẫn đến tăng hiệu suất hình thành insulin có hoạt tính hơn mô hình proinsulin. Đoạn peptide C ngắn hơn làm tăng khả năng gấp cuộn lên 20-40% so với proinsulin ở cùng nồng độ [1].

Pichia pastoris là hệ thống biểu hiện protein ngoại lai đang được các nhà khoa học chú ý bởi những đặc tính ưu việt như có thể thực hiện những biến đổi sau dịch mã, nuôi cấy ở mật độ cao tạo lượng sinh khối lớn trong quá trình lên men, thao tác dễ dàng [3]. Ngoài ra, hệ thống *P. pastoris* có thể sản xuất lượng lớn protein

mục tiêu với nguồn nguyên liệu methanol rẻ tiền và ít bị tạp nhiễm.

Nhằm mục đích sản xuất một lượng lớn insulin tái tổ hợp của người để phục vụ điều trị bệnh đái tháo đường, chúng tôi tiến hành cấu trúc chủng nấm men *P. pastoris* GS115::*h-mpi* biểu hiện MPI tái tổ hợp dạng tiết vào trong môi trường nuôi cấy. Kiểu hình và kiểu gen của chủng *P. pastoris* GS115::*h-mpi* cũng như khả năng biểu hiện protein dung hợp MPI-6xHis dạng tiết được xác định.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật, plasmid và môi

Chủng 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 đồng hóa các gen (Takara). Chủng *Pichia pastoris* GS115 [Mut⁺, *his4*] được sử dụng để biểu hiện protein mục tiêu.

Plasmid pMZZIn có nguồn gốc từ plasmid pUC19 mang đoạn gen *h-mpi* được dùng làm khuôn trong PCR thu nhận gen *h-mpi*. pPICZ α A (Invitrogen) là vector sát nhập vào *P. pastoris* có kích thước khoảng 3,6 kb, mang gen kháng Zeocin, trình tự tiết α -factor cho phép biểu hiện protein mục tiêu ở dạng tiết. Gen mục tiêu được điều khiển bởi promoter 5'AOX1.

Cặp mồi 3'*PHTI_Xba* (GTA CTC TAG ATT AGT TAC AGT AGT TCT CCA G) và 5'*PHTI_Xho* (ATG CCT CGA GAA AAG AGA AGA AGC TGA AGC TGA AGC TCC AAA GCA TCA CCA TCA CCA TCA CGG TGG AAG ATT TGT CAA CCA ACA TCT GTG) được dùng để khuếch đại gen *h-mpi*. Cặp

mồi 5'AOX1 và 3'AOX1 (Invitrogen) được dùng để sàng lọc và kiểm tra plasmid tái tổ hợp, giải trình tự đồng thời kiểm tra kiểu gen thể biến nạp *P. pastoris*.

Cấu trúc chủng *E. coli* DH5 α mang plasmid tái tổ hợp pPICZ α A/*h-mpi*

Quy trình tạo dòng *E. coli* DH5 α mang plasmid tái tổ hợp pPICZ α A/*h-mpi* được thực hiện như sau: thu nhận gen *h-mpi* mã hóa protein mini-proinsulin dung hợp với thể 6x histidine (6xHis-MPI) bằng PCR từ khuôn là plasmid pMZZIn sử dụng cặp mồi đặc hiệu 5'*PHTI_Xho* và 3'*PHTI_Xba*. Chương trình chạy PCR: 95 C/5'; 30 chu kỳ: 94 C/1', 55 C/45", 72 C/2'; kết thúc: 72 C/10'. Sản phẩm PCR được cắt với *XhoI* và *XbaI* để tạo đầu dính; thực hiện phản ứng nối gen *h-mpi* vào pPICZ α A đã được cắt mở vòng bằng enzyme tương ứng để hình thành plasmid tái tổ hợp pPICZ α A/*h-mpi*. pPICZ α A/*h-mpi* được biến nạp vào *E. coli* DH5 α bằng phương pháp biến nạp calcium lạnh [8]. Dòng tế bào *E. coli* DH5 α mang pPICZ α A/*h-mpi* được sàng lọc trên môi trường LB agar chứa Zeocin nồng độ cuối là 25 μ g/ml và kiểm tra dòng mục tiêu bằng PCR khuẩn lạc với cặp mồi 5'AOX1 và 3'AOX1. Chương trình chạy PCR: 95 C/5'; 30 chu kỳ (94 C/1', 55 C/45", 72 C/2'); 72 C/10'. Dòng tế bào mang pPICZ α A/*h-mpi* cho sản phẩm PCR với kích thước 751 bp được kiểm tra trên gel 1% agarose. Các thể biến nạp được tách chiết plasmid bằng phương pháp SDS kiểm [8]. Plasmid sau khi thu nhận được kiểm tra bằng PCR plasmid (sử dụng cặp mồi 5'AOX1 và 3'AOX1) và phương pháp cắt hạn

chế với *Xho*I và *Xba*I. Những plasmid dương tính được giải trình tự với kit BigDye™ Terminator (Macrogen Inc., Hàn Quốc). Kết quả giải trình tự được so sánh độ tương đồng với trình tự lý thuyết bằng phần mềm Jellyfish.

Cấu trúc chủng *P. pastoris* GS115::*h-mpi* mang plasmid tái tổ hợp pPICZaA/*h-mpi*

Nhằm tăng hiệu suất thành công trong quá trình sát nhập plasmid vào bộ gen *P. pastoris*, pPICZaA/*h-mpi* được xử lý với *Sac*I thành dạng thẳng. Sau đó, plasmid này được biến nạp vào *P. pastoris* GS115 bằng xung điện với hiệu điện thế 2,5 kV, điện trở 200 Ω và thời gian phát xung là 5 mili giây. Dòng tế bào *P. pastoris* tái tổ hợp được sàng lọc trên môi trường YPDS agar bổ sung Zeocin để đạt nồng độ cuối 100 µg/ml. Sau đó các thể biến nạp được kiểm tra kiểu hình dựa trên sự phát triển đồng đều trên môi trường MDH (minimal dextrose with histidine) và MMH (minimal methanol with histidine); kiểm tra kiểu gen bằng PCR với cặp mồi 5'AOX1 và 3'AOX1. Chương trình chạy tương tự như PCR khuẩn lạc.

Xác định khả năng biểu hiện MPI dạng tiết ra ngoài môi trường nuôi cấy

Cảm ứng biểu hiện *P. pastoris* GS115::*h-mpi* bằng methanol: Cấy một khuẩn lạc đơn vào 50 ml BMGY và nuôi cấy lắc ở 30 C qua đêm cho đến khi OD₅₈₀ đạt 2-6. Ly tâm 4000 rpm, 5 phút ở 4 C. Chuyển sang 200 ml BMMY để cảm ứng sự biểu hiện protein mục tiêu (OD₅₈₀ = 1 ở thời điểm 0 h). Sau mỗi 24 giờ bổ sung

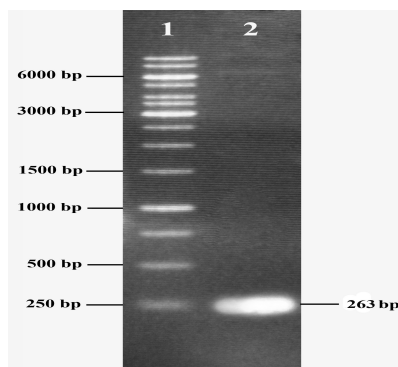
methanol vào môi trường BMMY nuôi cấy để đạt nồng độ cuối 0,5%. Sau 96 giờ thu dịch môi trường, bổ sung PMSF (phenyl methyl sulphonyl fluoride) để đạt nồng độ cuối là 1 mM và giữ ở -30 C.

Sự biểu hiện protein mục tiêu MPI-6xHis được kiểm tra bằng SDS-PAGE và khẳng định lại bằng lai Western sử dụng kháng thể đặc hiệu kháng insulin HUI018 (được cung cấp từ tiến sỹ Peer Nobert Jorgensen (*Novo Nordisk, Đan Mạch*)) và phát hiện nhờ kháng thể anti-mouse IgG-HRP (*Abcam*).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Cấu trúc chủng *E. coli* DH5α mang pPICZaA/*h-mpi*

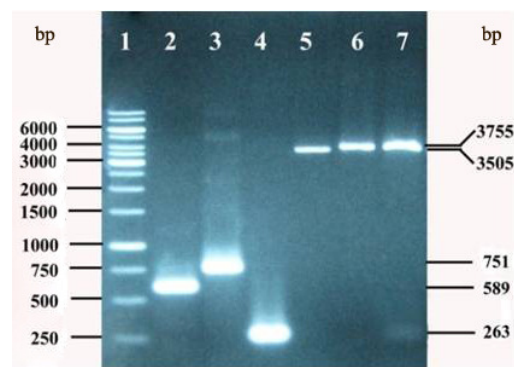
Plasmid pMZZIn mang gen *h-mpi* được dùng làm khuôn trong PCR thu nhận gen *h-mpi* bằng cặp mồi 5'PHTI-*Xho* và 3'PHTI-*Xba*. Sản phẩm PCR cho kích thước khoảng 250 bp phù hợp với kích thước dự kiến là 263 bp (Hình 1, giống 2). Các thể biến nạp được sàng lọc bằng PCR khuẩn lạc với cặp mồi 5'AOX1 và 3'AOX1. Plasmid từ những thể biến nạp cho kết quả PCR khuẩn lạc dương tính được tách chiết để kiểm tra bằng PCR và cắt hạn chế (Hình 2). Sự hiện diện của gen *h-mpi* được kiểm tra bằng PCR với các cặp mồi 5'AOX1 và 3'AOX1 (bắt cặp đặc hiệu trên vector) và 5'PHTI-*Xho* và 3'PHTI-*Xba* (bắt cặp đặc hiệu trên gen *h-mpi*).



Hình 1. Điện di đồ sản phẩm PCR gen *h-mpi* từ plasmid pMZZIn (2), thang chuẩn DNA 1 kb (1).

Sản phẩm PCR của pPICZαA/*h-mpi* (Hình 2, giếng 4) có kích thước khoảng 250 bp, tương ứng với kích thước gen *h-mpi* được khuếch đại bằng môi đặc hiệu 5'PHTI-*Xho* và 3'PHTI-*Xba* (263 bp). Bên cạnh đó, sản phẩm PCR plasmid tái tổ hợp với cặp môi 5'AOX1 và 3'AOX1 có kích thước khoảng 751 bp tương ứng với gen *h-mpi* (263 bp) cộng 1 phần trình tự giữa hai môi trên vector (Hình 2, giếng 3). Sản phẩm pPICZαA/*h-mpi* cắt bằng *Xho*I và *Xba*I cho hai vạch tương ứng với kích thước pPICZαA (3505 bp) và gen *h-mpi* (263 bp) (Hình 2, giếng 7). Trong khi đó, sản phẩm PCR pPICZαA (không mang gen *h-mpi*) bằng cặp môi 5'AOX1 và 3'AOX1 có kích thước 589 bp (Hình 2, giếng 2).

pPICZαA/*h-mpi* chứa gen mục tiêu *h-mpi* được giải trình tự để kiểm tra độ chính xác về trình tự cũng như độ đồng khung dịch mã. Trình tự nhận được có độ tương đồng 100% và đồng khung dịch mã với trình tự lý thuyết.



Hình 2. Điện di đồ sản phẩm PCR của pPICZαA (2), pPICZαA/*h-mpi* bằng cặp môi 5'AOX1_3'AOX1 (3), pPICZαA/*h-mpi* bằng cặp môi 5'PHTI-*Xho* và 3'PHTI-*Xba* (4), Sản phẩm cắt pPICZαA bằng *Xho*I (5), Sản phẩm pPICZαA/*h-mpi* bằng *Xho*I (6), pPICZαA/*h-mpi* bằng *Xho*I và *Xba*I (7), thang chuẩn DNA 1 kb (1).

Cấu trúc *P. pastoris* GS115::*h-mpi* mang pPICZαA/*h-mpi* sát nhập vào bộ gen

pPICZαA thuộc dạng vector sát nhập, khi biến nạp nó sát nhập vào bộ gen của tế bào chủ thông qua tái tổ hợp tương đồng. pPICZαA/*h-mpi* được biến nạp vào *P. pastoris* GS115 bằng điện biến nạp. Các thể biến nạp được sàng lọc dựa trên khả năng kháng kháng sinh zeocin. Những khuẩn lạc dự tuyển được thu nhận và tiếp tục kiểm tra kiểu gen và kiểu hình sử dụng methanol.

Kiểu hình và kiểu gen các *P. pastoris* GS115::*h-mpi*

Sau khi sàng lọc trên môi trường YPDS-Zeo100, các thể biến nạp được kiểm tra kiểu hình bằng cách ria đồng thời lên môi trường MDH và MMH. Dựa vào tốc độ phát triển của chúng trên cả hai môi trường để xác định kiểu hình (Hình 3).



Hình 3. Kiểu hình thể biến nạp GS115::h-mpi trên môi trường MDH (A) và MMH (B).

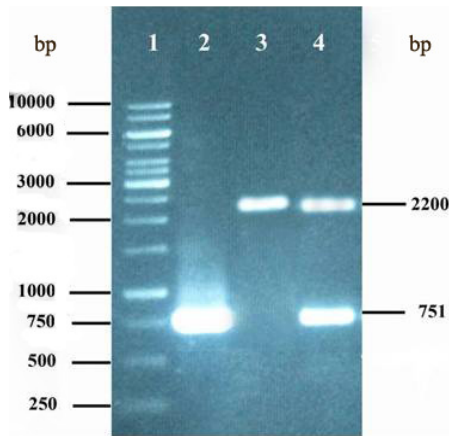
MDH là môi trường tối thiểu chứa dextrose còn MMH là môi trường chứa methanol làm nguồn carbon duy nhất. Thể biến nạp được trải trên hai môi trường, nếu tốc độ tăng trưởng đồng đều thì chứng tỏ thể biến nạp có khả năng sử dụng methanol mạnh hay nói cách khác, chúng có kiểu hình Mut⁺ (Methanol utilization plus). Ngược lại, nếu thể biến nạp tăng trưởng chậm trên môi trường MMH thì sẽ có kiểu hình Mut^s. Qua kết quả tăng trưởng trên hai môi trường MDH và MMH, cho thấy các thể biến nạp chọn lọc được có kiểu hình Mut⁺.

Để xác nhận sự phù hợp giữa kiểu hình và kiểu gen mang gen *h-mpi*, DNA bộ gen được ly trích từ các thể biến nạp và thực hiện PCR bằng cặp mồi 5'AOX1 – 3'AOX1.

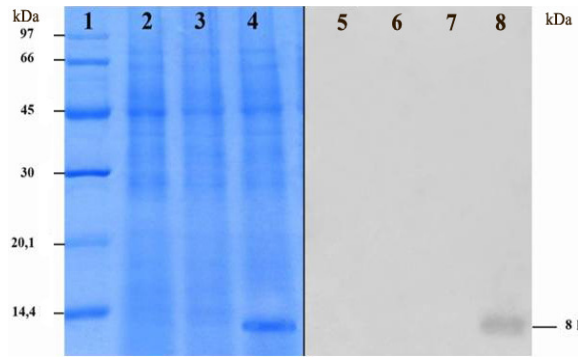
Sản phẩm PCR với khuôn là bộ gen từ các chủng Mut⁺ và cặp mồi 5'AOX1 – 3'AOX1 có kích thước khoảng 2200 bp (chứa gen AOX1) (Hình 4, giếng 3) còn từ chủng Mut^s thì

không có. Đồng thời đối với các chủng mang gen *h-mpi* xuất hiện vạch DNA có kích thước 751 bp (Hình 4, giếng 4)

Các thể biến nạp có kiểu hình Mut⁺ cho hai sản phẩm PCR: 751 bp (do cặp mồi bắt cặp với trình tự tương đồng 5'AOX1 và 3'AOX1 trên plasmid pPICZα/*h-mpi* đã sát nhập vào bộ gen) và 2200 bp (do cặp mồi bắt cặp với trình tự 5'AOX1 và 3'AOX1 sẵn có trên bộ gen của *P. pastoris* GS115) (Hình 4, giếng 4). Trong khi đó, bộ gen của *P. pastoris* không được sát nhập bởi pPICZα/*h-mpi* cho một vạch 2200 bp do mồi chỉ bắt cặp với trình tự 5'AOX1 và 3'AOX1 sẵn có trên bộ gen (Hình 4, giếng 3). Những thể biến nạp có kiểu hình Mut⁺ cho kết quả kiểu gen như dự đoán.



Hình 4. Điện di đồ sản phẩm PCR của pPICZαA/h-mpi (2), DNA bộ gen *P. pastoris* (3), DNA bộ gen *P. pastoris* GS115::h-mpi có kiểu hình Mut⁺ (4), thang chuẩn DNA 1 Kb (1).



Hình 5. Điện di SDS-PAGE (1-4) và lai Western (5-8). Thang chuẩn protein (1, 5); *P. pastoris* GS115::pPICZαA (2, 6); *P. pastoris* GS115::h-mpi không được (3, 7) và được cảm ứng methanol (4, 8).

Biểu hiện MPI ngoại bào ở *P. pastoris* GS115::h-mpi

Dòng tế bào *P. pastoris* GS115::h-mpi được cảm ứng biểu hiện gen *h-mpi* bằng methanol có vạch protein với kích thước khoảng 8 kDa (Hình 5, giếng 4). Các mẫu đối chứng (Hình 5, giếng 2 và 3) không thấy xuất hiện vạch protein này. Sau đó protein biểu hiện (dạng dung hợp 6xHis-MPI) được lai Western với kháng thể đặc hiệu kháng insulin HUI018 và phát hiện nhờ kháng thể anti-mouse IgG-HRP. Vạch lai Western (Hình 5, giếng 8) có vị trí tương ứng với vị trí vạch protein dự đoán là MPI-6xHis (Hình 5, giếng 4). Như vậy dòng *P. pastoris* GS115::h-mpi đã biểu hiện MPI-6xHis ngoại bào khi cảm ứng bằng methanol.

KẾT LUẬN

Chúng nắm men *P. pastoris* GS115::h-mpi đã được cấu trúc thành công và biểu hiện được protein mục tiêu 6xHis-MPI dạng ngoại bào. Bước đầu thử nghiệm khả năng lên men mật độ cao bằng hệ thống lên men tự động BioTron-LiFlus GX GX-05-12302 ở quy mô 1 lít đạt hàm lượng khoảng 178,4mg/l sau 96 giờ lên men (Dữ liệu không trình bày). Kết quả này nếu so với kết quả được công bố bởi Jose M. Pais và cộng sự (1,5g/l) vẫn còn thấp. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu của chúng tôi có thể cải thiện sau khi tiến hành khảo sát các điều kiện lên men tối ưu.

CONSTRUCTION OF YEAST *PICHA PASTORIS* EXPRESSING SECRETED MINI-PROINSULIN INTO CULTURE

Ngo Thi Kim Hang, Vo Minh Tri, Tran Linh Thuoc

University Science, VNU-HCM

ABSTRACT: Diabetes is one of the diseases, which have recently gained significant attention. In order to produce the recombinant insulin for treating diabetics, we have cloned and expressed a mini-proinsulin in *Pichia pastoris*. The DNA fragment containing a gene encoding the fusion protein of miniproinsulin-6xhis was cloned into the integrative plasmid pPICZ α A resulting in pPICZ α A/h-mpi to construct the strain *P. pastoris* GS115::h-mpi expressing the recombinant MPI as secreted protein into culture. Phenotype and genotype of *P. pastoris* GS115::h-mpi were confirmed by PCR and restriction pattern. MPI was expressed as a fusion protein with 6xhis tag by supplementing methanol at a final concentration of 0.5% in BMMY culture medium for 96 hours after inducing.

Key words: gene expression, mini-proinsulin, *Pichia pastoris*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. S. G. Chang, D. Y. Kim, K. D. Choi, J. M. Shin, H. C. Shin. Human insulin production from a novel mini-proinsulin which has high receptor-binding activity, *Biochem J.* 329, 631-635 (1998).
- [2]. J. M. Cregg, Vedvick, Raschke WC. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, 11, 905-910 (1993).
- [3]. R. Daly, M. T. Hearn, Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production, *J. Mol. Recognit*, 18, 119-138 (2005).
- [4]. International Diabetes Institute. *What is diabetes?*, Diabetes fact sheet (2004).
- [5]. S. Macauley-patrick, M. L. Fazenda, B. McNeil, L. M. Harvey, Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system, *Yeast*, 22, 249-270 (2005).
- [6]. N.H. Cường. *Bệnh nội tiết chuyển hóa đái tháo đường*, Nxb Y Học Hà Nội (2002).
- [7]. J. M. Pais-Chanfrou, Y. Garcia, L. Licor, V. Besada, Castellanos-Serra L, Cabello CI, et al, Improving the expression of mini-proinsulin in *Pichia pastoris*, *Biotechnol. Lett*, 26, 1269-1272 (2004).
- [8]. J. Sambrook, D. W. Russell, *Molecular Cloning, A laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor, NewYork (2001).