

Tạo dòng và biểu hiện nhân tố kích thích tạo dòng bạch cầu hạt – đại thực bào HGM-CSF (human granulocyte-macrophage colony stimulating factor) tái tổ hợp trên hệ thống *Pichia pastoris*

- Phạm Thị Kim Liên
- Đặng Tất Trường
- Trần Văn Hiếu

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 26 tháng 01 năm 2013, nhận đăng ngày 01 tháng 8 năm 2013)

TÓM TẮT

Nhân tố kích thích tạo dòng bạch cầu hạt - đại thực bào GM-CSF là một glycoprotein thuộc họ CSFs (colony stimulating factors). GM-CSF người tái tổ hợp (rhGM-CSF) là một trong những sản phẩm protein tái tổ hợp hiện nay được FDA chấp thuận để điều trị các bệnh như neutropenia, leukemia, sử dụng kết hợp với hóa trị trong điều trị ung thư, ... Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tạo dòng và biểu hiện rhGM-CSF dạng tiết trên hệ thống nấm men *Pichia pastoris* dưới sự điều hòa của promoter AOX1. Gen *hgm-csf* mã hóa cho protein hGM-CSF có kích thước 415bp được thu nhận từ phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu hGM-F và hGM-R lần lượt mang vị trí nhận biết của enzyme *XhoI* và *NotI*. Sau khi xử lý với hai enzyme này, gen *hgm-csf* được chèn vào vector biểu hiện *pPICZαA* ngay tại vị trí *XhoI* và *NotI*. Vector *pPICZαA* tái tổ hợp mang gen *hgm-csf* đặt dưới sự kiểm soát của

promoter AOX1, *pPICZαA/hGM-CSF*, có khả năng biểu hiện protein hGM-CSF trên hệ thống nấm men *P. pastoris*. Vector *pPICZαA/hGM-CSF* được kiểm tra bằng phương pháp PCR, cắt hạn chế và giải trình tự; kết quả giải trình tự cho thấy gen *hgm-csf* đồng khung dịch mã và trình tự acid amin mã hóa tương đồng 100% so với các trình tự công bố trên ngân hàng gen. Vector này sau khi xử lý với enzyme *SacI* được điện biến nạp vào tế bào nấm men *P. pastoris* X33 để tạo thành chủng tái tổ hợp *P. pastoris* X33::*hgm-csf*. Khi nuôi cấy chủng tái tổ hợp trên môi trường cảm ứng BMMY có chứa methanol, protein hGM-CSF được biểu hiện ở dạng tiết ra môi trường nuôi cấy. Kết quả phân tích SDS-PAGE và Western blot với kháng thể đặc hiệu cho thấy protein này biểu hiện ra ở cả dạng glycosyl hóa với kích thước 20 kDa, 29-35 kDa, và dạng không glycosyl hóa, 14,7 kDa.

Từ khóa: CSFs, hGM-CSF, *Pichia pastoris*, *pPICZαA*, SDS-PAGE.

MỞ ĐẦU

hGM-CSF là một cytokin tham gia trực tiếp vào quá trình biệt hóa, tăng sinh và tồn tại của các dòng tế bào bạch cầu hạt và đại thực bào (Prasanta Ghosh, 2007). Một trong những ứng dụng chính của hGM-CSF là điều trị chứng giảm bạch cầu cấp (neutropenia) khi tham gia kích thích sự tạo thành, trưởng thành và tồn tại của nhiều dòng tế bào máu khác nhau (Prasanta Ghosh, 2007). Protein này còn thể hiện nhiều khả năng khác như giúp đẩy mạnh chức năng tế bào đơn nhân và đại thực bào ở bệnh nhân đang điều trị ung thư, kích thích các dòng tế bào này ly giải các tế bào ung thư; giúp tăng cường khả năng trình diện kháng nguyên của tế bào tua thông qua việc tăng cường sự biểu hiện của MHC-II và di chuyển nên có tiềm năng sử dụng như tá dược vaccine; trong chứng viêm, GM-CSF góp phần nhiều đến sự hình thành các tế bào miễn dịch để duy trì tình trạng ổn định các dòng tế bào này trong cơ thể khi cơ thể bị nhiễm khuẩn và có đáp ứng viêm (Prasanta Ghosh, 2007).

Protein hGM-CSF gồm 127 amino acid, có 2 vị trí N-glycosyl hóa và 4 vị trí O-glycosyl hóa. Dạng tự nhiên của GM-CSF có kích thước khoảng 23kDa (đã được glycosyl hóa) (Prasanta Ghosh, 2007). Protein hGM-CSF tái tổ hợp được sản xuất có nhiều dạng với kích thước khác nhau tùy vào mức độ glycosyl hóa. Mức độ glycosyl hóa có ảnh hưởng đến được động học, tính kháng nguyên và tính độc của protein này. Với nhiều lí do trên nên Sagramotism, hGM-CSF được glycosyl hóa tái tổ hợp thu nhận từ nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*) là sản phẩm thương mại đang được ứng dụng sử dụng rộng rãi hiện nay (Palash Bhattacharya et al., 2007). Ngoài hệ thống biểu hiện trên *S. cerevisiae*, hGM-CSF dạng glycosyl hóa tái tổ hợp được biểu hiện ở nhiều hệ thống khác như *Escherichia coli* và được glycosyl hóa *in vitro*, tế bào nấm men, tế bào động vật hữu nhũ,... Ngoài *S. cerevisiae*, hệ thống *Pichia pastoris* với nhiều ưu điểm nổi trội

trong biểu hiện protein tái tổ hợp cũng đang được nghiên cứu rộng rãi cho việc biểu hiện glycoprotein này. GM-CSF được biểu hiện ở hệ thống *Pichia pastoris* ở dạng tan và được tiết ra ngoài môi trường nuôi cấy nên tạo điều kiện dễ dàng cho quá trình thu nhận và tinh chế; protein có cấu hình đúng và không bị glycosyl hóa quá mức như ở *S. cerevisiae*. Thêm vào đó, hệ thống *P. pastoris* dễ đạt mật độ nuôi cấy cao trên môi trường dinh dưỡng rẻ tiền, đảm bảo được tính bền của gen *hgm-csf* nhờ cơ chế gắn chèn vào bộ gen. Việc biểu hiện hGM-CSF trên *P. pastoris* thông qua hệ thống điều hòa promoter AOX1 được cảm ứng bởi methanol; đây là một cơ chất rẻ tiền, đồng thời cũng thích hợp đối với các protein độc với tế bào hơn so với hệ thống biểu hiện liên tục (Cereghino JL et al., 2000). Trong khuôn khổ nghiên cứu này, chúng tôi ứng dụng hệ thống *Pichia pastoris* với sự điều hòa của promoter AOX1 để biểu hiện protein hGM-CSF ở dạng tiết ra môi trường nuôi cấy.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật, vector và môi trường

Chủng tế bào *Escherichia coli* DH5 α [F-, ϕ 80lacZ Δ M15, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), phoA, supE44, λ -, thi-1, gyrA96, relA1] và *Pichia pastoris* X33 hoang dại, có kiểu hình Mut⁺ có nguồn gốc từ Invitrogen. Plasmid pGM-CSF mang gen *hgm-csf* được tổng hợp nhân tạo thông qua công ty IDT (Hoa Kỳ). Plasmid pPICZ α A (Invitrogen), được sử dụng để biểu hiện protein hGM-CSF trong *P. pastoris*. Các môi trường được sử dụng trong đề tài gồm: LB (10 g/L trypton, 5 g/L cao nấm men, 5 g/L NaCl), LB-Kan (môi trường LB có bổ sung kanamycin 30 μ g/ml), LB-Zeocin (môi trường LB có bổ sung zeocin 25 μ g/ml), YPD (10 g/L cao nấm men, 20 g/L peptone, 100ml glucose 20%), YPD-Zeocin (môi trường YPD có bổ sung zeocin 100 μ g/ml), BMGY (10 g/L cao nấm men; 20 g/L peptone, 13,4 g/L YNB, 100 ml potassium

phosphate buffer 1M pH 6,0, 2 ml biotin 0,02%, 12,5 ml glycerol 80%), BMMY (10 g cao nấm men; 20 g peptone, 13,4g YNB, 100 ml potassium phosphate buffer 1M pH 6,0; 2 ml biotin 0,02%, 100 ml methanol 5% trong 1 lít nước cất), MM (13,4g Yeast Nitrogen Base (YNB), 2 ml biotin 0,02%, 100ml methanol 5% trong 1 lít nước cất), MD (13,4g YNB, 2ml biotin 0,02%, 100 ml glucose 20% trong 1 lít nước cất).

Tạo dòng chủng E.coli DH5 α mang vector pPICZ α A/hGM-CSF

PCR với cặp mồi đặc hiệu hGM-F/hGM-R để thu nhận gen *hgm-csf* từ plasmid pGM-CSF. Xử lí sản phẩm PCR với 2 enzyme *XhoI* và *NotI*. Đồng thời plasmid pPICZ α A được xử lí với 2 enzyme này giúp mở vòng plasmid và tạo đầu dính để nối với gen *hgm-csf*. Các sản phẩm cắt được tinh chế bằng bộ kit EZ-10 Spin Column DNA và sử dụng cho phản ứng nối bằng T4 DNA ligase. Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E.coli* DH5 α khả nạp và trải hỗn hợp biến nạp trên đĩa môi trường LB-Zeocin25, ủ 37°C trong 16-18 giờ, thực hiện đối chứng âm với đĩa trải tế bào *E.coli* DH5 α không biến nạp sản phẩm nối. Trên đĩa biến nạp, các khuẩn lạc hình thành và sẽ được sàng lọc và kiểm tra để thu nhận dòng tế bào *E. coli* DH5 α mang plasmid tái tổ hợp. Các kỹ thuật được sử dụng là:

PCR khuẩn lạc: các khuẩn lạc được pick up và thực hiện phản ứng PCR khuẩn lạc với cặp mồi hGM-F/hGM-R.

PCR và cắt hạn chế plasmid: các khuẩn lạc dương tính sẽ được nuôi cấy để tách plasmid và kiểm tra plasmid này bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu trên gen và cặp mồi đặc hiệu trên plasmid 5'AOX1/3'AOX1 cùng với phương pháp cắt hạn chế với 2 enzyme *XhoI* và *NotI*.

Giải trình tự gen hgm-csf: plasmid sau kiểm tra được giải trình tự với cặp mồi 5'AOX1/3'AOX1. Kết quả giải trình tự được so sánh và phân tích bằng phần mềm Jellyfish (Lab Velocity).

Tạo dòng chủng P. pastoris X33::hgm-csf

Nhằm tăng khả năng sát nhập gen *hgm-csf* vào bộ gen chủng chủ *P. pastoris* X33 theo cơ chế tái tổ hợp tại một vị trí, plasmid tái tổ hợp pPICZ α A/hGM-CSF được cắt với enzyme *SacI*. Sau đó, sản phẩm cắt được tinh chế và điện biến nạp vào tế bào *P. pastoris* X33 khả nạp. Hỗn hợp biến nạp được trải trên môi trường YPD-Zeocin100, ủ ở 30°C trong 2 - 5 ngày. Tiến hành đồng thời một mẫu đối chứng âm với tế bào X33 khả nạp. Các khuẩn lạc mọc trên đĩa biến nạp được thu nhận và được cấy trên hai môi trường MM và MD để xác định kiểu hình sử dụng methanol; sau đó thực hiện PCR khuẩn lạc với cặp mồi 5'AOX1/3'AOX1 để kiểm tra kiểu gen. Dòng tái tổ hợp thu nhận sau các bước kiểm tra được đặt tên là *P.pastoris* X33::hgm-csf.

Biểu hiện hGM-CSF

Chủng tái tổ hợp được hoạt hóa và tăng sinh trên 10 ml môi trường BMGY có bổ sung zeocin nồng độ cuối 100 ug/ml với điều kiện lắc 250 rpm ở 30°C. Sau khi đạt OD600 từ 2 - 4, tiến hành thu sinh khối và chuyển sang 10ml môi trường BMMY, nuôi cấy lắc 250 rpm ở 30°C. Cảm ứng bằng methanol nồng độ cuối 0,5% sau mỗi 24 giờ nuôi cấy. Sau 72 giờ cảm ứng, ly tâm thu nhận dịch nuôi cấy để phân tích.

Phân tích SDS-PAGE

Sự biểu hiện hGM-CSF được phân tích bằng phương pháp điện di SDS-PAGE 15% và protein được phát hiện bằng nhuộm bạc.

Lai Western

Thực hiện lai Western với kháng thể đặc hiệu kháng hGM-CSF (Abcam) để xác nhận sự hiện diện của hGM-CSF trong dịch nuôi cấy. Protein được chuyển lên màng nitrocellulose sau SDS-PAGE, hiện phim nhờ ECL kit (Amersham)

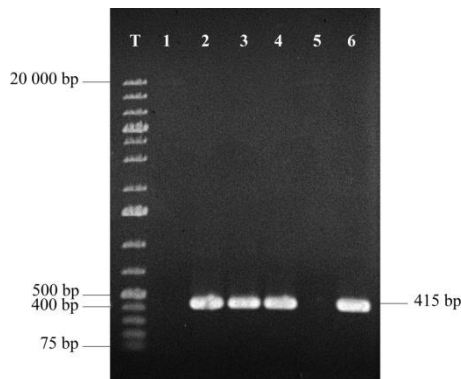
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tạo dòng E. coli DH5 α mang plasmid biểu hiện pPICZ α A/hGM-CSF

Sàng lọc dòng tế bào *E.coli* mang plasmid pPICZαA/hGM-CSF bằng PCR khuẩn lạc

Tế bào *E. coli* DH5α là tế bào nhạy cảm với Zeocin nên không thể phát triển được trên môi trường LB-Zeocin, trong khi đó các tế bào *E. coli* DH5α đã nhận plasmid có gen *Zeocin^R* (plasmid tái tổ hợp hay plasmid tự nối) sẽ đề kháng với Zeocin nên phát triển được trên môi trường LB-Zeocin nên hình thành các khuẩn lạc trắng trên môi trường này Các khuẩn lạc này sẽ được chọn làm khuẩn lạc dự tuyển cho bước kiểm tra sau.

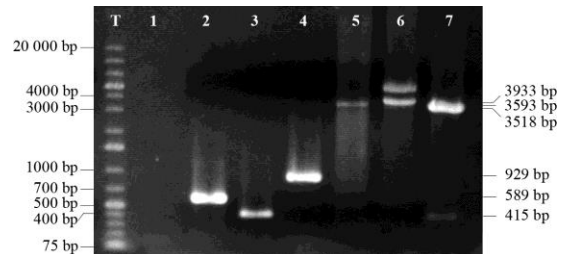
Các khuẩn lạc trên được sàng lọc bằng phương pháp PCR khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu hGM-F/hGM-R. Kết quả điện di trên gel agarose 1% cho thấy sản phẩm PCR của khuẩn lạc trên đĩa biến nạp (giếng 3, 4, 6, Hình 2) cho vạch DNA nằm giữa 2 vạch 400 bp và 500 bp của thang chuẩn DNA (giếng 1, Hình 1) và bằng với đối chứng dương là sản phẩm PCR plasmid pGM-CSF với cặp mồi đặc hiệu (giếng 2, Hình 1), phù hợp với kích thước dự kiến là 415 bp (bao gồm cả vị trí các enzyme cắt hạn chế). Kết quả PCR khuẩn lạc được thể hiện trên giếng 4 không có vạch DNA nào, có thể do các tế bào khuẩn lạc này chứa plasmid không mang gen.



Hình 1. Sàng lọc thể biến nạp bằng PCR khuẩn lạc. T, thang DNA; 1, đối chứng âm; 2, PCR pGM-CSF (hGM-F/hGM-R); 3,4,5,6, PCR khuẩn lạc (hGM-F/hGM-R)

Kiểm tra plasmid tái tổ hợp pPICZαA-hGM-CSF

Plasmid của các thể biến nạp cho kết quả PCR khuẩn lạc dương tính sẽ được kiểm tra đồng thời bằng phương pháp PCR với cặp mồi 5'AOX1/3'AOX1, cặp mồi hGM-F/hGM-R và phương pháp cắt hạn chế.



Hình 2. Kiểm tra plasmid pPICZαA tái tổ hợp bằng kỹ thuật PCR và cắt giới hạn. T, Thang DNA GenRuler™ 1 kb Plus (Fermentas); 1, PCR pPICZαA với cặp mồi hGM-F/hGM-R; 2, PCR pPICZαA với cặp mồi 5'AOX1/3'AOX1; 3, PCR pPICZαA/hGM với cặp mồi hGM-F/hGM-R; 4, PCR pPICZαA/hGM với cặp mồi 5'AOX1/3'AOX1; 5, Plasmid pPICZαA được cắt bằng XhoI và NotI; 6, Plasmid pPICZαA/hGM được cắt bằng NotI; 7, Plasmid pPICZαA/hGM được cắt bằng XhoI và NotI.

Sản phẩm PCR kiểm tra được điện di trên gel agarose 1% (Hình 2). Với mỗi đặc hiệu trên gen, phản ứng PCR khuếch đại một đoạn có kích thước 415bp (giếng 3), bằng với kích thước của đối chứng dương; với cặp mồi bắt cặp trên plasmid, 5'AOX1/3'AOX1, cho một vạch DNA nằm giữa hai vạch 700 bp và 1000 bp của thang chuẩn DNA 1kb, phù hợp với kết quả dự kiến là 929 bp (giếng 4).

Đồng thời đó, thực hiện phản ứng cắt plasmid tái tổ hợp bằng 1 enzyme (*NotI*), và hai enzyme (*XhoI* và *NotI*). Khi cùng được cắt bằng enzyme *NotI* có sự chênh lệch kích thước giữa plasmid tái tổ hợp vừa thu nhận và plasmid pPICZαA không mang gen (giếng 5 và 6). Như vậy, đã chèn được một đoạn gen vào plasmid pPICZαA. Đoạn gen này có kích thước tương đương với kích thước gen mục tiêu, kết quả được thể hiện khi cắt plasmid tái tổ hợp với hai

enzyme dòng hóa *XhoI* và *NotI* (giếng 7) cho ra hai vạch, 1 vạch bằng với kích thước plasmid bản mẫu, hai vạch bằng kích thước sản phẩm PCR plasmid tái tổ hợp với mỗi đặc hiệu trên gen.

Sau đó, để tiến hành kiểm tra sự chính xác của gen được chèn vào về mặt trình tự; chúng tôi giải trình tự plasmid tái tổ hợp với cặp mồi 5'AOX1/3'AOX1. Sử dụng phần mềm Jellyfish để sắp giống cột và phân tích, gen *hgm-csf* dòng hóa được có sự tương đồng 100% so với trình tự lí thuyết và đồng khung dịch mã với trình tự tín hiệu tiết α -MF.

Như vậy, đã cấu trúc thành công chủng *E. coli* DH5 α /pPICZ α A/hGM-CSF.

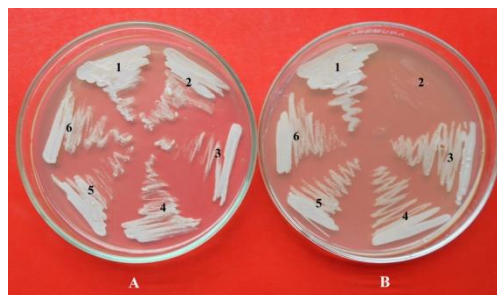
Tạo dòng tế bào *Pichia pastoris* X33 mang gen *hgm-csf*

Kiểm tra kiểu hình sử dụng methanol

Plasmid tái tổ hợp pPICZ α A/hGM-CSF dạng thẳng (đã cắt bằng *SacI*) được biến nạp vào tế bào *P. pastoris* X33 khả nạp, thể biến nạp được sàng lọc trên môi trường YPD-Zeocin. Các khuẩn lạc dự tuyển trên đĩa biến nạp được tiếp tục kiểm tra kiểu hình và kiểu gen.

Tùy thuộc vào khả năng sử dụng methanol mà kiểu hình thể biến nạp có thể là Mut⁺ hoặc Mut^S. Chúng có kiểu hình Mut⁺ mọc được trên cả 2 đĩa môi trường MM và MD, chúng có kiểu hình Mut^S không mọc hoặc mọc rất yếu trên môi trường MM và chỉ mọc được trên môi trường MD. Kết quả trên Hình 3 cho thấy hầu hết các dòng thu nhận đều phát triển tốt trên cả môi trường MM và MD nên chúng có kiểu hình Mut⁺. Các thể biến nạp này được tiếp tục kiểm tra về kiểu gen.

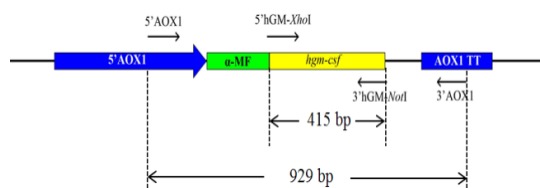
X33 (giếng 3-7). Như vậy, ở chủng tái tổ hợp có khả năng gen *hgm-csf* đã được sát nhập vào bộ gen, đồng thời gen *aox1* vẫn hiện diện. Do đó, kiểu hình của chúng tái tổ hợp là Mut⁺.



Hình 3. Kiểm tra kiểu hình thể biến nạp. 1, Môi trường MD; 2, Môi trường MM.

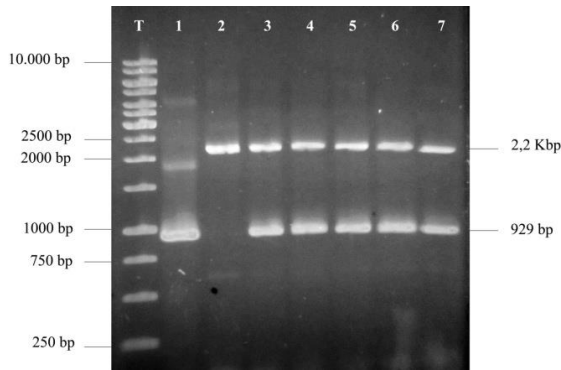
Kiểm tra kiểu gen của chủng nấm men X33 dự tuyển đã xác nhận kiểu hình Mut⁺

Khi plasmid được chuyển vào tế bào có thể xảy ra sự sát nhập vào bộ gen của tế bào nấm men theo hai phương thức: chèn gen và thay thế gen. Do chiến lược sử dụng hướng đến phương thức tái tổ hợp tương đồng tại vị trí promoter AOX1 nên đa phần các thể biến nạp sẽ có sự chèn gen, do đó gen *aox1* vẫn hiện diện trên bộ gen nấm men. Tuy nhiên do sự tái tổ hợp vẫn có thể theo hướng thay thế gen nên các thể biến nạp dự tuyển sẽ được kiểm tra bằng phương pháp PCR với cặp mồi 5' AOX1/3' AOX1.



Hình 4. Vị trí các mồi trên DNA bộ gen chủng *P. pastoris* tái tổ hợp

Kết quả điện di (Hình 5) cho thấy sản phẩm PCR của DNA bộ gen chủng *P. pastoris* tái tổ hợp gồm hai vạch: một vạch có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR plasmid pPICZ α A/hGM-CSF có kích thước 929 bp và một vạch có kích thước 2,2 Kbp tương ứng với phần gen *aox1* của chủng *P. pastoris*.



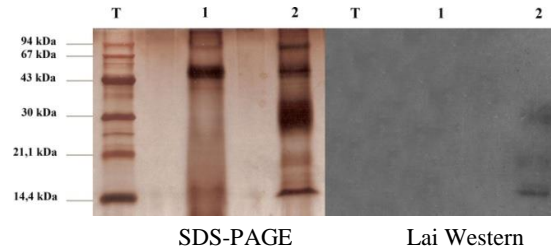
Hình 5. Kiểm tra kiểu gen thể biến nạp *P. pastoris* X33. T, Thang chuẩn DNA; 1, PCR plasmid pPICZαA/hGM-CSF/5'AOX/ 3'AOX1; 2, PCR *P. pastoris* X33/5'AOX1/3'AOX1; 3-7, PCR khuẩn lạc các thể biến nạp

Kiểm tra sự biểu hiện protein hGM-CSF ở dòng *P. pastoris* X33::hgm-csf

P. pastoris X33::hgm-csf được nuôi cấy và cảm ứng bằng methanol 0,5% trong 72 giờ. Dịch nuôi cấy lãc sau khi loại bỏ sinh khối được phân tích bằng phương pháp SDS-PAGE. Trong Hình 6, giếng 2 là mẫu protein tổng số trong dịch lên men của chủng *P. pastoris* X33::hgm-csf khi có cảm ứng metanol, xuất hiện 3 vạch protein khác biệt so với đối chứng âm (giếng 1): một vạch có kích nằm giữa hai vạch 14,4 kDa và 20 kDa tương ứng với kích thước của protein hGM-CSF trên lý thuyết khi không glycosyl hóa, một vạch có kích thước khoảng 20 kDa, một vạch có kích thước khoảng 29-35 kDa (giếng 2). Chúng tôi dự đoán, đây là các dạng glycosyl hóa khác nhau của protein mục tiêu, hGM-CSF.

Để khẳng định lại kết quả SDS-PAGE trên, khi thực hiện lai Western với kháng thể kháng hGM-CSF, trên bản phim lai có ba vạch tín hiệu

ở giếng 2. Vị trí các vạch tín hiệu này tương ứng với ba vạch protein trên bản gel SDS-PAGE đã đề cập.



Hình 6. Kiểm tra sự biểu hiện bằng điện di SDS-PAGE và khẳng định protein hGM-CSF bằng Western blot. T, Thang chuẩn protein; 1, *P. pastoris* X33::hgm-csf (- methanol); 2, *P. pastoris* X33::hgm-csf (+ methanol)

Như vậy có thể khẳng định đã cảm ứng biểu hiện hGM-CSF dạng tiết thành công ở chủng *P. pastoris* X33::hgm-csf. Các protein GM-CSF tái tổ hợp với các mức độ glycosyl hóa khác nhau này sẽ được tiếp tục tiếp hành tinh chế nhằm phân riêng các protein này và so sánh hoạt tính của từng loại. Đây là cơ sở để có thể tiến hành lên men sản xuất thử nghiệm ở quy mô lớn.

KẾT LUẬN

- Đã cấu trúc thành công chủng *E. coli* DH5α/ pPICZαA/hGM-CSF
- Đã cấu trúc thành công chủng *P. pastoris* X33::hgm-csf
- Biểu hiện thành công protein hGM-CSF dạng tiết ra môi trường nuôi cấy.

LỜI CẢM ƠN: Đề tài được thực hiện bằng kinh phí của đề tài khoa học công nghệ cấp Sở của Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh.

Cloning and expression of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) in *Pichia pastoris*

- PhamThi KimLien
- Dang Tat Truong
- Tran Van Hieu

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) is a glycoprotein, belongs to the family of colony stimulating factors (CSFs) that regulate proliferation and differentiation of hematopoietic cells. Recombinant hGM-CSF (rhGM-CSF) is one of FDA-approved, therapeutic recombinant proteins that have been successfully used to treat many diseases like neutropenia, leukemia, or in combination with chemical therapy, etc. In this study, we reported the production of rhGM-CSF in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* through secretory expression using the inducible AOX1 promoter. The gene *hgm-csf* encoding for hGM-CSF comprising of 415 bps was isolated using PCR reaction with two primers hGM-F and hGM-R bearing *XhoI* and *NotI* restriction sites, respectively. After double digesting with these enzymes, the *hgm-csf* fragment was cloned into *pPICZαA* shuttle vector, between the *XhoI* and *NotI* sites. Recombinant vector

containing the gene *hgm-csf*, termed *pPICZαA/hGMCSF*, under the control of promoter AOX has the ability to express hGM-CSF in *P. pastoris*. The accuracy of cloning strategy was confirmed by digestion with REs, PCR and sequencing. Sequencing alignment showed that the cloned gene completely homologous to those published on Genbank. *SacI* linearized *pPICZαA/hGM-CSF* was transformed into *P. pastoris* X33 strain to establish the recombinant *P. pastoris* X33::*hgm-csf*. In methanol-contained, inducing BMMY medium, the recombinant X33 cells expressed and secreted hGM-CSF into the supernatant. The secreted hGM-CSF migrated as a band at about 20 kDa, a diffuse band at the range of 29 to 35 kDa, indicating differentially glycosylated forms, and a band at 14,7kDa which is a non-glycosylated form on SDS-PAGE gel. This result was confirmed by Western blot with specific antibodies.

Keywords: CSFs, hGM-CSF, *Pichia pastoris*, *pPICZαA*, SDS-PAGE.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. J.L. Cereghino, J.M. Cregg, Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *FEMS Microbiol Rev.* 24, 45-66 (2000).
- [2]. P. Bhattacharya, G. Pandey, et al, Production and purification of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) from high cell density cultures of *Pichia pastoris* (2007).
- [3]. P.K. Ghosh, D. Bhardwaj, R. Karnik, Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: The protein and its current & emerging applications (2007).