

BIỂU HIỆN PROTEIN TÁI TỔ HỢP MIRACULIN TRONG DÒNG TẾ BÀO THUỐC LÁ BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. Cv Bright Yellow-2)

La Việt Hồng^{1,2}, Nguyễn Thu Giang¹, Phạm Bích Ngọc¹, Chu Hoàng Hà^{1*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *chuhongha@ibt.ac.vn

²Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

TÓM TẮT: Miraculin là một protein tạo cảm giác ngọt và ít sinh năng lượng, được tách chiết từ quả cây thần kỳ (*Richadella dulcifica*), một loại cây bụi ở Tây Phi. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tổng hợp nhân tạo gen miraculin với mã di truyền được tối ưu hóa trong dòng tế bào thuốc lá BY-2. Gen miraculin được chèn vào hai cấu trúc pBI₁₂₁/HSP-pro:Mir:HSP-ter với promoter và terminator của gen HSP 18.2 được phân lập từ cây *Arabidopsis thaliana* có hiệu quả tăng cường biểu hiện của protein tái tổ hợp và pBI₁₂₁/35S-pro:Mir:NOS-ter. Các cấu trúc này được sử dụng để chuyển gen miraculin vào các dòng tế bào thuốc lá BY-2. Các dòng tế bào BY-2 được đánh giá bằng kỹ thuật PCR và lai miễn dịch Western blot. Kết quả cho thấy, chúng tôi đã tạo được các dòng tế bào BY-2 sinh trưởng ổn định trong môi trường lỏng sau 4-5 lần cấy chuyển với khoảng cách giữa mỗi lần là 2 tuần. Các dòng BY-2 sinh trưởng ổn định và biểu hiện protein tái tổ hợp miraculin có kích thước khoảng 43-45 kDa, trong đó các dòng tế bào BY-2 được chuyển cấu trúc HSP-pro:Mir:HSP-ter biểu hiện mạnh hơn so với các dòng BY-2 được chuyển cấu trúc 35S-pro:Mir: NOS-ter. Đây là lần đầu tiên ở Việt Nam và trên thế giới, protein tạo cảm giác ngọt miraculin được biểu hiện trong dòng tế bào thuốc lá BY-2. Kết quả này mang lại tiềm năng lớn cho nghiên cứu và sản xuất protein miraculin trong thực tiễn.

Từ khóa: Béo phì, BY-2, cảm giác ngọt, cây thần kỳ, miraculin, tế bào thuốc lá.

MỞ ĐẦU

Miraculin là một protein tạo cảm giác ngọt được tách ra từ quả cây thần kỳ (*Richadella dulcifica*), là loại cây bụi sống ở vùng Tây Phi [14, 15]. Miraculin là protein ít sinh năng lượng và có tiềm năng thay thế chất làm ngọt nhân tạo, cải thiện đáng kể chế độ ăn cho người mắc bệnh tiểu đường và béo phì [6]. Tuy nhiên, khả năng thương mại hóa miraculin bị hạn chế vì cây thần kỳ phân bố ở vùng nhiệt đới khắc nghiệt, sinh trưởng chậm, quả nhỏ và khó bảo quản [14].

Ngày nay, với sự phát triển của kỹ thuật di truyền đặc biệt là bằng các công cụ sinh học phân tử, đã giúp cho con người có thể vượt qua rào cản về loài, giúp sản xuất được các protein cũng như các chất mong muốn. Dòng tế bào thuốc lá BY-2 được phân lập bởi Kato et al. (1972) có rất nhiều ưu điểm như độ đồng đều cao, có tốc độ sinh trưởng nhanh, lên đến 80-100 lần sau một tuần nuôi cấy, có hàm lượng rất thấp nicotine so với cây thuốc lá nguyên vẹn [12]. Đây là một trong số ít dòng tế bào thực vật được sử dụng để sản xuất protein tái tổ hợp: protein erythropoietin của người [10, 11], đoạn

kháng thể bscFv [3], kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (mAb against HbsAg) [16], protein hGM-CSF (Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) [5].

Sự biểu hiện của protein tái tổ hợp trong thực vật có thể được tăng cường nhờ tối ưu mã di truyền của gen đích với hệ thống sinh tổng hợp protein của hệ thống biểu hiện, vector biểu hiện, sự dung hợp gen đích, các yếu tố tham gia vào quá trình phiên mã và dịch mã [2]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành chuyển gen miraculin nhân tạo thông qua hai cassette biểu hiện khác nhau trong dòng tế bào BY-2, đánh giá các dòng tế bào BY-2 chuyển gen bằng kỹ thuật PCR và lai miễn dịch Western blot.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Gen miraculin nhân tạo có mã di truyền được tối ưu hóa: khai thác thông tin trình tự nucleotide của gen miraculin (D38598.1 và AB512278.1) trên Ngân hàng Gen quốc tế. Tối ưu hóa mã di truyền bằng chương trình Codon

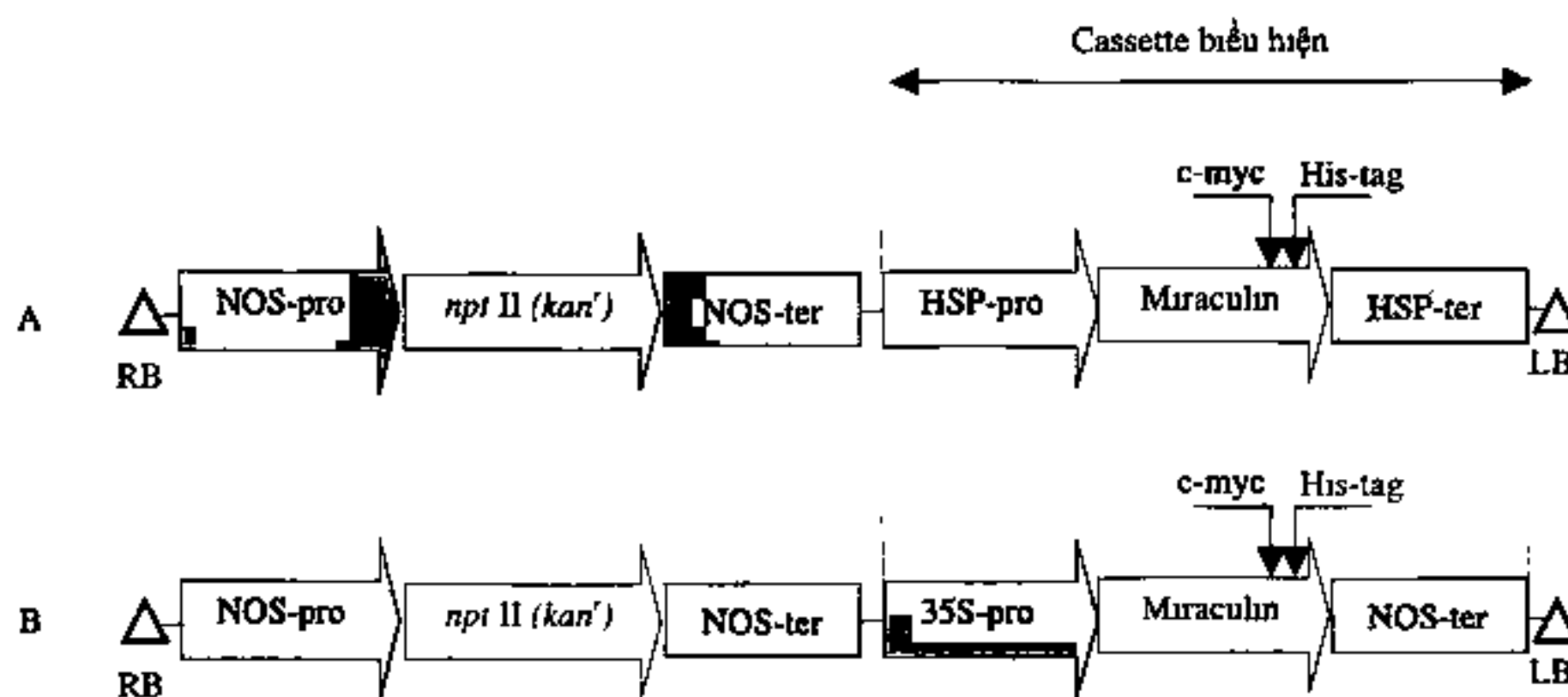
Usage Database [4] và Codon Optimization 2.0 của Invitrogen. Đoạn trình tự nucleotide mã hóa cho c-myc tag và epitope His-tag được gắn vào đầu 3' của đoạn DNA. Hai vị trí nhận biết của enzyme giới hạn *Bam*HI và *Sac*I được thêm vào đầu 5' và 3' của gen miraculin theo thứ tự tương ứng, gen miraculin được tối ưu có kích thước là 761 bp. Trình tự nucleotide của cặp mồi đặc hiệu cho gen miraculin được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Trình tự nucleotide của cặp mồi Mir_opt_F/R đặc hiệu cho gen miraculin

Kí hiệu cặp mồi	Trình tự nucleotide 5'→3'
Mir_opt_F	ATGAAGGAACTTACTATGTTGAG
Mir_opt_R	AGGATCTGAATGGTTCC

Gen miraculin được tổng hợp tại hãng

Epoch Life Science (Hoa Kỳ) và được nhân dòng trong vector pBluescript II SK. Dòng tế bào thuốc lá BY-2 đang nuôi cấy trong điều kiện *in vitro*, chủng vi khuẩn chuyển gen *Agrobacterium tumefaciens*, chủng *E. coli* DH5 α mang vector biểu hiện do Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Công nghệ Sinh học cung cấp. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng hai vector biểu hiện: pBI₁₂₁/HSP-pro:Miraculin:HSP-ter, chứa promoter và terminator của gen sốc nhiệt *HSP* 18.2 (heat shock protein) được chúng tôi phân lập từ cây *Arabidopsis thaliana* đã đăng ký trên Ngân hàng Gen quốc tế với mã số lần lượt là KM083119 và KP008108 nhằm tăng cường biểu hiện protein miraculin và vector pBI₁₂₁/35S-pro:Mir:NOS-ter (hình 1) đã được nhân dòng trong chủng *E. coli* DH5 α .



Hình 1. Sơ đồ vector biểu hiện miraculin với cassette khác nhau: (A) pBI₁₂₁/HSP-pro:Mir:HSP-ter; (B) pBI₁₂₁/35S-pro:Mir:NOS-ter

NOS-pro: promoter nopaline synthase gene, npt II: gen kháng kanamycin, NOS-ter: terminator nopaline synthase gene, HSP-pro và HSP-ter: promoter và terminator của gen *HSP* 18.2, 35S-pro: promoter CaMV35S, c-myc: trình tự nucleotide mã hóa protein c-Myc, His-tag: trình tự nucleotide mã hóa cho chuỗi axit amin Histidine; RB và LB: biên phải và biên trái của T-DNA.

Protein c-Myc được tổng hợp từ khuẩn bởi Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam. Kháng thể anti-mouse IgG cộng hợp HRP của hãng Promega (USA).

Phương pháp chuyển gen vào tế bào BY-2 thông qua vi khuẩn Agrobacterium

Quy trình chuyển gen vào dòng tế bào thuốc lá BY-2 thông qua *Agrobacterium*, quá trình chọn lọc dòng BY-2 mang gen được tiến hành

theo phương pháp của Nocarova & Fischer (2009) [13].

Kiểm tra sự có mặt của gen miraculin dòng tế bào BY-2 bằng kỹ thuật PCR

Sử dụng DNA được tách chiết từ các dòng tế bào BY-2 làm khuôn cho phản ứng PCR để kiểm tra sự có mặt của gen chuyển miraculin bằng cặp mồi đặc hiệu Mir_opt_F/R (bảng 1) theo chu trình như sau: 94°C/3phút; 94°C/45 giây, 54°C/30 giây, 72°C/45 giây; 72°C/10 phút,

lặp lại 30 chu kỳ.

Kiểm tra sự biểu hiện của protein miraculin trong tế bào BY-2 bằng kỹ thuật lai miễn dịch Western blot

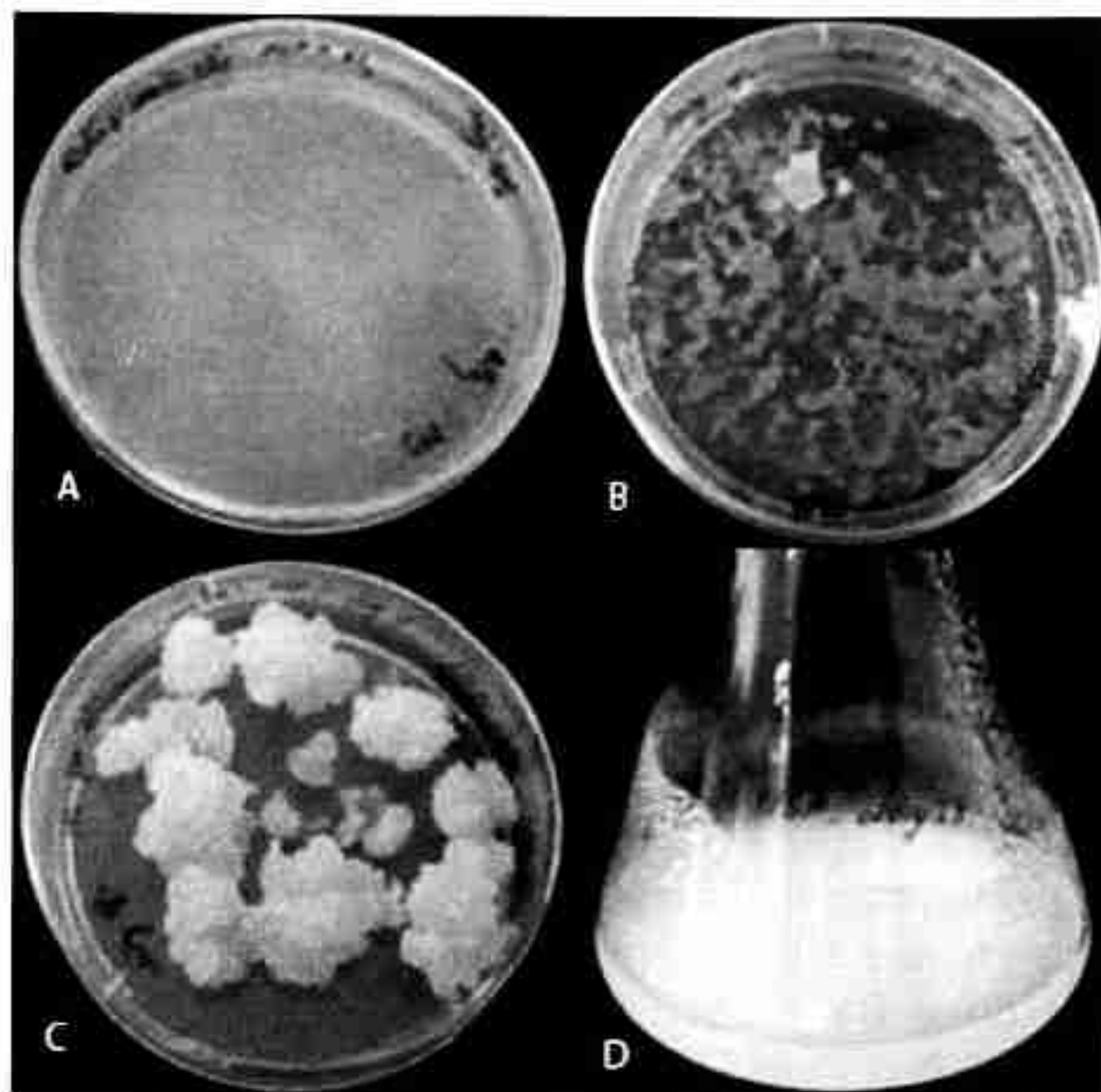
Đối với các dòng tế bào BY-2 chuyển cấu trúc HSP-pro:Mir:HSP-ter, chúng tôi tiến hành xử lý sốc nhiệt [9] ở 37°C trong 2 giờ, sau đó nuôi phục hồi 4 giờ ở 27°C, thu sinh khối tế bào để tách chiết protein cho các thí nghiệm tiếp theo. Thu tế bào BY-2, nghiền thành bột mịn trong nitơ lỏng bằng cối chày sứ, bổ sung đệm PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X. Thu dịch nghiền vào ống eppendorf 2 ml, ly tâm 10.000 vòng/phút ở 4°C, thu dịch protein ở phía trên. Protein tổng số được định lượng bằng phương pháp so màu của Bradford (1976). Biểu hiện của protein miraculin được kiểm tra bằng kỹ thuật lai miễn dịch theo phương pháp của Burnette (1981) [1] với một số cải biến. Protein được phân tách bằng điện di SDS-PAGE 12% theo phương pháp của Laemmli (1970) [8], sau đó chuyển lên màng nitrocellulose bằng máy chuyển màng *fast blotter* của hãng Thermo Scientific Pierce ở 25V, 1.3A trong 20 phút. Sau khi blocking bằng sữa tách béo 5% pha trong PBST (0,05% Tween trong đệm PBS) trong 5 giờ, màng được ủ với kháng thể 1 anti-c-Myc pha loãng 100 lần bằng PBS chứa 5% sữa tách béo qua đêm trước khi ủ với kháng thể 2 anti-mouse IgG cộng hợp HRP pha loãng 2.500 lần bằng PBS chứa 5% sữa tách béo trong 2 giờ. Sự có mặt của miraculin trong mẫu được phát hiện nhờ phản ứng hiện màu bằng cơ chất TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tạo dòng tế bào thuốc lá BY-2 chuyển gen miraculin

Trong thí nghiệm này, sau khi lây nhiễm và đồng nuôi cấy với vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector biểu hiện khác nhau, huyền phù tế bào BY-2 được cấy trái nhẹ trên môi trường chọn lọc có bổ sung kanamycin ở nồng độ cao (100 mg/l). Do trong quá trình xâm nhiễm, ngoài cấu trúc gen miraculin, gen *nptII* trên vector chuyển gen mã hóa cho enzyme phân hủy kanamycin cũng được tích hợp vào genome tế bào chủ nên chỉ những tế bào được chuyển

gen mới có thể sống sót trên môi trường chứa kháng sinh kanamycin, các cụm callus được hình thành trên môi trường chọn lọc được dùng nuôi cấy trên môi trường lỏng (tốc độ lắc 130 vòng/phút), dưới áp lực chọn lọc của kháng sinh kanamycin, sau 4-5 lần cấy chuyển với khoảng cách giữa các lần là 2 tuần, chúng tôi chọn được những dòng BY-2 sinh trưởng ổn định kết quả được thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Quá trình chuyển gen miraculin vào dòng tế bào thuốc lá BY-2

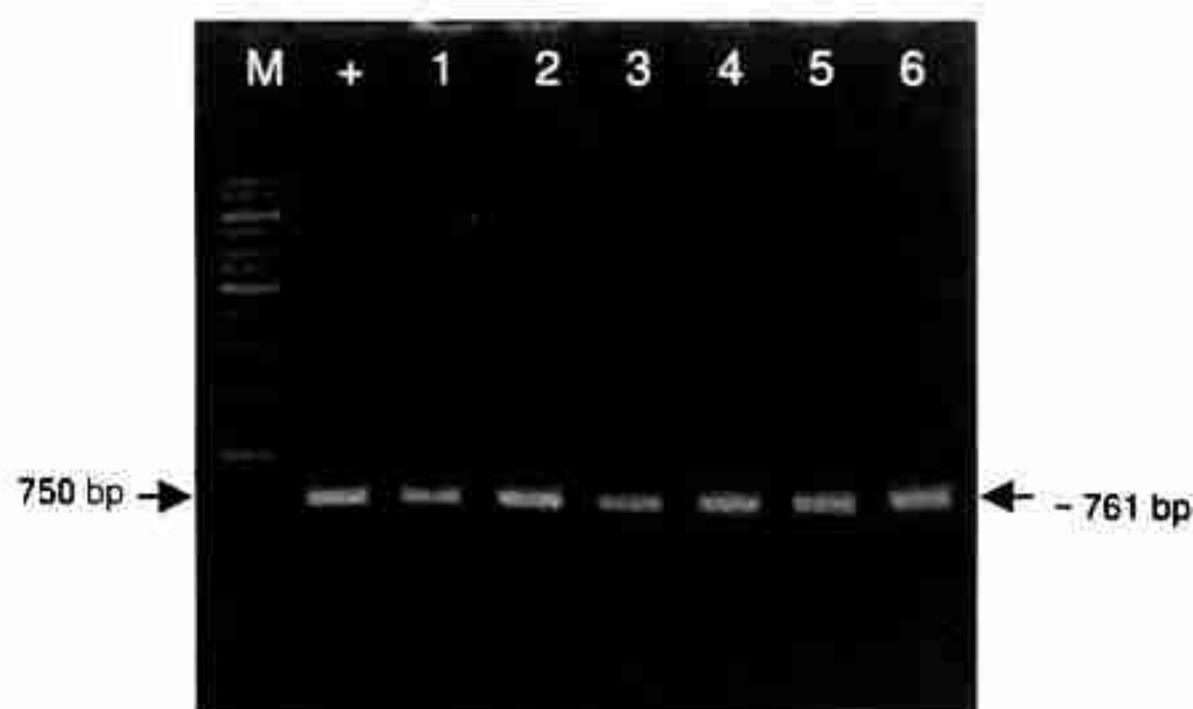
A. Đồng nuôi cấy giữa vi khuẩn *A. tumefaciens* mang cassette biểu hiện khác nhau với tế bào BY-2 chùng dại; B. Callus BY-2 được tái sinh trên môi trường chọn lọc sau 3 tuần nuôi cấy; C. Callus trên môi trường chọn lọc sau 2 tuần cấy chuyển; D. Tái huyền phù callus BY-2 trên môi trường lỏng chứa tác nhân chọn lọc.

Kiểm tra sự có mặt của gen miraculin trong dòng tế bào BY-2 bằng kỹ thuật PCR

Để đánh giá sự có mặt của gen miraculin nhân tạo trong các dòng tế bào BY-2, chúng tôi chọn ngẫu nhiên 3 dòng với mỗi cấu trúc từ các dòng BY-2 ổn định sau 4-5 lần cấy chuyển trên môi trường lỏng có bổ sung kháng sinh chọn lọc, tiến hành tách chiết DNA và thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho gen miraculin. Kết quả điện di sản phẩm được thể hiện ở hình 3.

Phân tích kết quả ở hình 3 cho thấy các giếng điện di đều xuất hiện một băng đặc hiệu

kích thước khoảng 750 bp, kích thước này tương ứng với kích thước phân đoạn gen miraculin được chúng tôi thiết kế (761 bp). Kết quả này khẳng định, chúng tôi đã chuyển thành công gen miraculin có mã di truyền được tối ưu vào tế bào BY-2, các dòng tế bào BY-2 này được sử dụng làm nguyên liệu để đánh giá sự biểu hiện của protein tái tổ hợp miraculin bằng kỹ thuật lai miễn dịch.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu của gen miraculin trên gel agarose 0,8% (w/v)

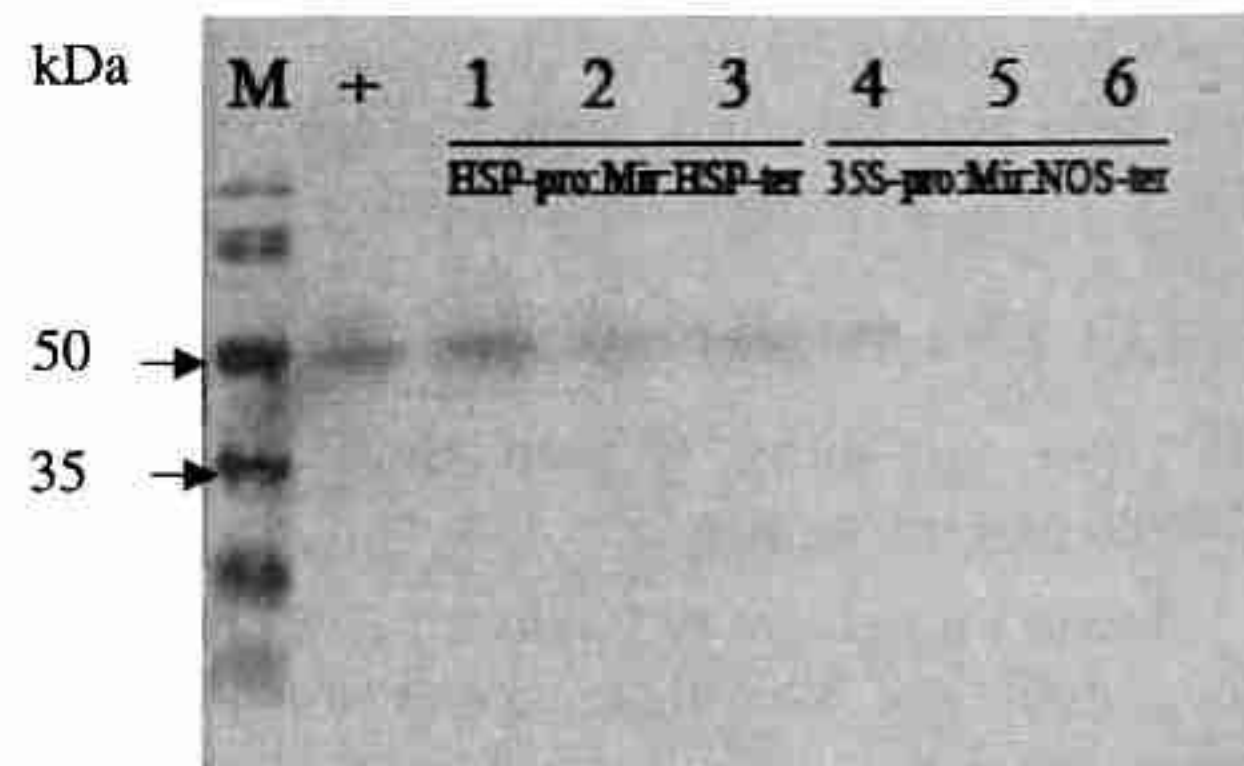
(+). Đối chứng dương; 1-3. các dòng BY-2 được chuyển cấu trúc pBI₁₂₁/HSP-pro:Mir:HSP-ter; 4-6. các dòng BY-2 được chuyển cấu trúc pBI₁₂₁/35S-pro:Mir:NOS-ter; M. thang DNA chuẩn 1 kb (Fermentas)

Kiểm tra sự biểu hiện của protein miraculin dòng tế bào BY-2 bằng kỹ thuật lai miễn dịch Western blot

Sự biểu hiện của protein tái tổ hợp là đích đến quan trọng trong quá trình chuyển gen vào thực vật. Để kiểm tra và đánh giá sự biểu hiện của protein miraculin trong tế bào BY-2, các dòng tế bào BY-2 chuyển gen và một dòng không chuyển gen dùng làm đối chứng âm được tách chiết protein để tiến hành phản ứng lai miễn dịch Western blot. Như kết quả cho thấy ở phần trên, chúng tôi đã thiết kế gắn đuôi c-myc vào gen miraculin nhằm phát hiện sự có mặt của protein miraculin trong mẫu protein tổng số bằng sử dụng kháng thể anti-c-Myc. Độ nhạy của phản ứng lai miễn dịch được đánh giá bằng đối chứng dương là protein tái tổ hợp có gắn đuôi cmyc. Kết quả được thể hiện ở hình 4.

Kết quả chỉ ra các dòng tế bào BY-2 chuyển gen miraculin 1, 2, 3 được chuyển cassette

HSP-pro:Mir:HSP-ter và dòng số 4 chuyển cassette 35S:Mir:NOS xuất hiện một băng kích thước khoảng 43-45 kDa. Kết quả này cũng phù hợp với một số nghiên cứu trước đây về miraculin tự nhiên và miraculin tái tổ hợp. Theo một nghiên cứu của Kurihara (1992) [7], miraculin tách chiết từ quả thần kỳ là một glycoprotein, tồn tại ở dạng dimer gồm hai phân tử miraculin liên kết với nhau qua liên kết disulfit, có khối lượng phân tử dimer khoảng 43 kDa. Ở một nghiên cứu khác, khi biểu hiện miraculin tái tổ hợp trong cây rau diếp chuyển gen, nhóm nghiên cứu Sun et al. (2006) [14] đã xác định khối lượng phân tử của miraculin tái tổ hợp khoảng 45 kDa trên gel SDS-PAGE trong điều kiện không khử, kết quả đó có thể do miraculin tái tổ hợp tồn tại dạng dimer và bị glycosyl hóa. Phân tích chi tiết hình 4 cho thấy, mức độ biểu hiện khác nhau giữa các dòng tế bào BY-2 1, 2, 3 và 4. Cụ thể dòng 1, 2 và 3 biểu hiện mạnh hơn so với dòng 4. Trong khi đó, dòng 5 và 6 không cho thấy sự biểu hiện của miraculin mặc dù kiểm tra PCR cho thấy 2 dòng tế bào BY-2 này đều mang gen đích miraculin, kết quả này có thể do hiện tượng gen chuyển không hoạt động [14]. Tóm lại, kết quả phân tích bằng lai miễn dịch một lần nữa khẳng định chúng tôi đã chuyển thành công gen miraculin và đã biểu hiện thành công protein tái tổ hợp miraculin trong một số dòng tế bào thuốc lá BY-2.



Hình 4. Kết quả lai western blot kiểm tra sự biểu hiện của protein miraculin trong các dòng tế bào BY-2

(+). Đối chứng dương; 1, 2, 3. dòng tế bào BY-2 được chuyển cấu trúc pBI₁₂₁/HSP-pro:Mir:HSP-ter; 4, 5, 6. dòng tế bào BY-2 được chuyển cấu trúc pBI₁₂₁/35S-pro:Mir:NOS-ter; (-). Đối chứng âm
Phản ứng lai sử dụng kháng thể anti-c-Myc.

KẾT LUẬN

Tạo được các dòng tế bào BY-2 ổn định biểu hiện protein tái tổ hợp miraculin, các dòng tế bào BY-2 được chuyển cấu trúc HSP-pro:Mir:HSP-ter mang promoter và terminator của gen *HSP 18.2* từ cây *Arabidopsis thaliana* được sốc nhiệt ở 37°C trong 2 giờ và phục hồi ở 27°C trong 4 giờ có mức độ biểu hiện mạnh hơn so với dòng tế bào BY-2 được chuyển cấu trúc 35S-pro:Mir:NOS-ter.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này nhận được sự hỗ trợ về thiết bị và hóa chất của đề tài: “Nghiên cứu sản xuất protein tái tổ hợp trong cây cà chua chuyển gen” Mã số VAST02.01/13-14. Thực nghiệm được tiến hành tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Burnette W. N., 1981. “Western blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *Anal. Biochem.*, 112: 195-203.
2. Desai P. N., Shrivastava N., Padh H., 2010. Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression. *Biotechnol. Adv.*, 28: 427-435.
3. Fischer R., Schumann D., Zimmermann S., Drossard J., Sack M., Schillberg S., 1999. Expression and characterization of bispecific single-chain Fv fragments produced in transgenic plants. *Eur. J. Biochem.*, 262: 810-816.
4. <http://www.kazusa.or.jp/codon/index.html>.
5. James E. A., Wang C., Wang Z., Reeves R., Shin J. H., Magnuson N. S., Lee J. M., 2000. Production and characterization of biologically active human GM-CSF secreted by genetically modified plant cells. *Protein Expr. Purif.*, 19: 131-138.
6. Kant R., 2005. Sweet proteins-Potential replacement for artificial low calorie sweeteners. *Nutr J.*, 4:5. doi:10.1186/1475-2891-4-5.
7. Kurihara Y., 1992. Characteristics of antisweet substances, sweet proteins, and sweetness-inducing proteins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32: 231-252.
8. Laemmli U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-685.
9. Lee K. T., Chen S. C., Chiang B. L., Yamakawa T., 2007. Heat-inducible production of beta-glucuronidase in tobacco hairy root cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73: 1047-1053.
10. Matsumoto S., Ikura K., Ueda M., Sasaki R., 1995. Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol. Biol.*, 27: 1163-1172.
11. Matsumoto S., Ishii A., Ikura K., Ueda M., Sasaki R., 1993. Expression of human erythropoietin in cultured tobacco cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57: 1249-1252.
12. Nagata T., Nemoto Y., Seiichiro H., 1992. Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.*, 132: 1-30.
13. Nocarova E., Fischer L., 2009. Cloning of transgenic tobacco BY-2 cells; an efficient method to analyse and reduce high natural heterogeneity of transgene expression. *BMC Plant Biol.*, 9:44. doi:10.1186/1471-2229-9-44
14. Sun H. J., Cui M. L., Ma B., Ezura H., 2006. Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce. *FEBS Lett.*, 580: 620-626.
15. Theerasilp S., Hitotsuya H., Nakajo S., Nakaya K., Nakamura Y., Kurihara Y., 1989. Complete amino acid sequence and structure characterization of the taste-modifying protein, miraculin. *J. Biol. Chem.*, 264(12): 6655-6659.
16. Yano A., Maeda F., Takekoshi M., 2004. Transgenic tobacco cells producing the human monoclonal antibody to hepatitis B virus surface antigen. *J. Med. Virol.*, 73: 208-215.

EXPRESSION OF A TASTE-MODIFYING PROTEIN, MIRACULIN, IN BY-2 TOBACCO CELL LINE (*Nicotiana tabacum* L. Cv Bright Yellow 2)

La Viet Hong^{1,2}, Nguyen Thu Giang¹, Pham Bich Ngoc¹, Chu Hoang Ha¹

¹Institute of Biotechnology, VAST

²Hanoi Pedagogical University N^o2

SUMMARY

Miraculin is a taste-modifying and low calorie protein isolated from the red berries of *Richadella dulcifica*, a shrub native to West Africa. In this study, a synthetic miraculin gene was designed to optimize its codon usage for BY-2 tobacco cell lines. This gene was inserted into two constructs including pBI₁₂₁/HSP-pro:Mir:HSP-ter that contains HSP promoter and HSP terminator isolated from *Arabidopsis thaliana* for enhancing production of miraculin and pBI₁₂₁/35S-pro:Mir:NOS-ter for transformation into BY-2 tobacco cell lines. The presence and expression of miraculin gene in BY-2 tobacco cell lines were verified by PCR and Western blot, respectively. It was demonstrated that transgenic BY-2 tobacco cell lines grew stably in liquid media after 4-5 times of transplant. The expression of miraculin gene in transgenic BY-2 tobacco cell lines resulted in the accumulation of miraculin protein with molecular mass of approximately 43-45 kDa. Besides, it was observed that the expression of miraculin in HSP-pro:Mir:HSP-ter transformed BY-2 tobacco cell lines is better than the expression of miraculin in 35S-pro:Mir:HSP-ter transformed ones. For the first time, miraculin recombinant protein has been expressed in BY-2 tobacco cells providing a great potential for research and production of miraculin protein at industrial scale.

Keywords: *Arabidopsis*, *Nicotiana*, *Richadella*, BY-2, diabetes, miracle fruit, miraculin, taste-modifying protein.

Ngày nhận bài: 5-4-2014