

NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN VÀ THU NHẬN hG-CSF CÓ HOẠT TÍNH TỪ THỂ VÙI KHÔNG ĐIỂN HÌNH BIỂU HIỆN TRONG *E. COLI* Ở QUY MÔ MỘT LÍT

Nguyễn Thị Phương Hiếu, Đặng Thị Phương Thảo, Trần Linh Thuờ

Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Sự hình thành protein chủ yếu ở dạng thể vùi không có hoạt tính là khó khăn thường gặp khi biểu hiện vượt mức protein tái tổ hợp trong *E. coli*, đặc biệt là các protein được ứng dụng làm thuốc. Những nghiên cứu gần đây cho thấy có thể thu nhận trực tiếp protein có hoạt tính từ dạng thể vùi không điển hình, có chứa các tiền chất gấp cuộn đúng bên trong, mà không cần trải qua quá trình tái gấp cuộn phức tạp (Jevšvar, 2005). Điều này đã mở ra triển vọng mới trong việc phát triển công nghệ sản xuất protein được liệu. Trong những công bố trước, chúng tôi đã biểu hiện thành công hG-CSF ở dạng thể vùi không điển hình bằng hệ thống cảm ứng stress và thu nhận trực tiếp protein có hoạt tính từ dịch hòa tan thể vùi. Sự biểu hiện protein hG-CSF tái tổ hợp trong chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET-gcsf được cảm ứng bởi IPTG 0,5mM với nhiệt độ thấp và sự hiện diện của nhân tố gây stress isopropanol. Thể vùi không điển hình sau đó sẽ được thu nhận và hòa tan bằng N-lauroylsarcosine 0,2% (w/v). Hệ thống này tiếp tục được phát triển ở quy mô 1L, và đạt hiệu quả là 33,04mg hG-CSF có hoạt tính trong 1L dịch lên men. Protein hG-CSF tái tổ hợp sau đó cũng được tinh chế thành công bằng phương pháp sắc ký ái lực có định ion IMAC với hiệu suất là 91,36%. Hoạt tính sinh học của protein sau khi tinh chế là $9,24 \times 10^7$ IU/mg với độ tinh sạch là 91,7%. Kết quả này cho thấy hiệu quả và triển vọng trong việc sản xuất chế phẩm thuốc hG-CSF với một quy trình sản xuất mới, đơn giản, ít tốn kém.

Từ khóa: hG-CSF, thể vùi không điển hình, biểu hiện gen, dòng tế bào M-NFS60, IMAC

MỞ ĐẦU

Sự hình thành protein chủ yếu ở dạng thể vùi là khó khăn thường gặp khi biểu hiện vượt mức protein tái tổ hợp trong *E. coli*, đặc biệt là các protein được ứng dụng làm thuốc. Bên trong thể vùi, protein chủ yếu ở dạng gấp cuộn sai, không có hoạt tính và cần trải qua quá trình tái gấp cuộn phức tạp để thu nhận được dạng có hoạt tính (Sorensen *et al.*, 2005). Những nghiên cứu gần đây của Peternel và đồng tác giả (2008) cho thấy có sự hình thành các tiền chất gấp cuộn đúng bên trong một dạng thể vùi mới – thể vùi không điển hình. Dạng thể vùi này dễ dàng bị phá vỡ bằng các chất biến tính ở nồng độ rất thấp để thu nhận protein có hoạt tính bên trong mà không cần trải qua bước biến tính, hồi tính phức tạp. Điều này đã mở ra triển vọng mới trong việc phát triển công nghệ sản xuất protein được liệu.

Với hướng chiến lược này, chúng tôi nhận thấy rằng protein G-CSF khi được biểu hiện trong *E. coli* ở nhiệt độ thấp (25°C) với sự hiện diện của nhân tố gây stress tế bào isopropanol sẽ được hình thành chủ yếu ở dạng thể vùi không điển hình có chứa lượng lớn tiền chất gấp cuộn đúng bên trong (Nguyễn Thị Phương Hiếu *et al.*, 2009). Lượng thể vùi này dễ dàng bị hòa tan bởi N-Lauroylsarcosine 0,2% để thu

nhận protein có hoạt tính ở bên trong.

Trong bài báo cáo này, chúng tôi trình bày các kết quả nghiên cứu biểu hiện và thu nhận hG-CSF từ dạng thể vùi không điển hình ở quy mô 1 lít và tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực có định ion IMAC. Các kết quả thu được cho thấy hiệu quả và triển vọng của quy trình sản xuất h-GCSF có hoạt tính từ thể vùi không điển hình mà không cần trải qua giai đoạn tái gấp cuộn phức tạp và tốn kém.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật

Chủng tái tổ hợp *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET-gcsf (Nguyễn Thị Phương Hiếu *et al.*, 2009) được sử dụng để lên men biểu hiện protein hG-CSF. Chủng này có mang plasmid pET-gcsf chứa gen gcsf mã hóa cho protein hG-CSF, được dùng để biểu hiện hG-CSF dưới sự kiểm soát của promoter T7 khi có mặt của IPTG và có mang gen kháng ampicillin.

Biểu hiện và thu nhận protein hG-CSF dạng thể vùi không điển hình ở quy mô 1 lít

Các chủng được cấy từ đĩa petri vào 5 ml môi

trường LB-Amp 100 µg/ml, nuôi cấy lắc ở 250 rpm, 37°C trong 12-14 giờ (khi OD₆₀₀ đạt giá trị từ 1,2-1,5). Sử dụng 5 ml giống này cấy chuyển vào 150 ml môi trường cấp 2 (bổ sung ampicilin 100 µg/ml) để nuôi cấy cấp 2, nuôi cấy lắc ở 37°C, 250 rpm trong 12-14 giờ. Sau đó nạp giống vào bình lên men theo tỷ lệ 5%, đồng thời bổ sung kháng sinh (ampicilin nồng độ 100 µg/ml) và các thành phần cần thiết khác. Tiến hành lên men thu nhận hG-CSF dạng thể vùi không điện hình ở điều kiện khuấy trộn 250 vòng/phút, pH 7, DO 20%, nhiệt độ 25°C, tốc độ sục khí: 1 vvm, nồng độ tác nhân stress là isopropylol 1%. Sau 20 giờ lên men, xác định mật độ tế bào (OD₆₀₀) và tiến hành ly tâm thu sinh khối. Rửa và huyền phù sinh khối vào dung dịch pha màng tế bào (Tris-HCl pH 8, 50 mM, EDTA 1 mM, PMSI 1 mM) theo tỷ lệ 10 ml cho 1 g sinh khối tươi. Dịch huyền phù này được cho đi qua máy phá M-110EH-30 Microfluidizer Processor nhằm đồng nhất hóa tế bào ở điều kiện 700 bar qua 2 chu kỳ. Dịch tế bào đã đồng nhất hóa được đem đi ly tâm ở 7.000 vòng/phút, 30 phút và rửa lại tua hai lần bằng nước cất.

Hòa tan thể vùi để thu nhận protein hG-CSF có hoạt tính

Thể vùi thu nhận từ tế bào được hòa tan trong dung dịch Tris HCl pH 8,0 40mM, chứa tác nhân gây biến tính nhẹ N-lauroyl-sarcosine 0,2% theo tỷ lệ 1:50 (m.v). Huyền phù thể vùi trong dung dịch hòa tan được lắc nhẹ ở 15°C, 120 vòng/phút, 18 - 24 giờ. Sau đó, ly tâm thu nhận dịch nổi và tua ở 6.000 vòng/phút, 30 phút, ở 10°C. Dịch nổi và tua ly tâm được trích một phần để kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE. Dịch nổi được thu nhận, bảo quản ở 4°C, trích một phần dùng cho thử hoạt tính trên tế bào.

Tinh chế protein hG-CSF bằng phương pháp sắc ký cố định ion IMAC

Loại cột tinh chế sắc ký ái lực cố định kim loại được sử dụng trong quá trình tinh chế hG-CSF là cột HisTrap FF (GE Healthcare). Quá trình khảo sát được tiến hành trên cột 5ml, có gắn Ni²⁺ trên chất hấp phụ. Cân bằng cột bằng dung dịch Tris-HCl 40 mM, pH 8,0. Nạp vào cột 10 ml dịch hòa tan thể vùi có nồng độ hG-CSF là 150 µg/ml và rửa cột bằng dung dịch Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0. Protein hG-CSF sẽ được ly giải bằng dung dịch NaOAc 20 mM, NaCl 100 mM, pH 4,0. Dịch chứa h-GCSF thu nhận được sẽ được phân tích và đánh giá bằng SDS-PAGE và RP-HPLC. Protein thu được sẽ được kiểm tra hoạt tính sinh học trên tế bào M-NFS-60.

Phân tích cấu hình hG-CSF bằng phương pháp RP-HPLC

RP-HPLC được tiến hành sử dụng cột C4 4,6 mm/250 mm (GL science Inc). Pha động gồm trifluoroacetic acid 0,1% trong acetonitril (A) và trifluoroacetic acid 0,1% trong dH₂O (B). Tỷ lệ dung dịch A được tăng một cách tuyến tính 36% trong 30 phút, tốc độ dòng được giữ ở 0,8ml/phút, bước sóng hấp thụ là 215 nm. Nồng độ của hG-CSF cũng được xác định dựa vào RP-HPLC bằng cách dựng đường chuẩn giữa nồng độ Neupogen và diện tích đỉnh hấp thụ ghi nhận được.

Thử nghiệm hoạt tính sinh học của hG-CSF trên dòng tế bào M-NFS 60

Hoạt tính sinh học của protein hG-CSF được đánh giá thông qua khả năng kích thích tăng sinh tế bào M-NFS 60 (ATCC). Tế bào M-NFS-60 có nguồn gốc từ chuột *Mus musculus*, chỉ tăng sinh khi môi trường có chứa M-CSF, IL-3 hoặc G-CSF. Mẫu chuẩn Neupogen và hG-CSF sau tinh chế được pha loãng thành dãy nồng độ từ 10⁻² đến 10⁶ pg/ml. Bổ sung 50 µl mẫu và 50 µl dịch tế bào M-NFS 60 được nuôi trong môi trường RPMI 1640 với mật độ ban đầu là 10⁵ tế bào/ml vào đĩa 96 giếng. Đĩa được ủ trong tủ ấm 37°C, CO₂ 5% trong 48 giờ Sau đó bổ sung Cell counting kit (Dojindo, Nhật) theo tỷ lệ 1:10 và ủ tế bào ở 37°C trong 3 giờ. Đo giá trị OD₄₅₀. Kết quả được phân tích bằng phần mềm GraphPad Prism 5.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Biểu hiện và thu nhận protein hG-CSF từ thể vùi không điển hình ở quy mô 1 lít

Tiến hành lên men chủng tái tổ hợp *E coli* BL21(DE3)/pET-*gsf* trên môi trường thích hợp bằng hệ thống lên men tự động BioTron-LiFlus GX. Sau 20 giờ nuôi cấy, dịch lên men đạt OD₆₀₀=11,36 được tiến hành ly tâm thu sinh khối, phá tế bào và thu nhận thể vùi không điển hình. Kết quả từ 1 lít dịch lên men, chúng tôi thu nhận được 4,39 g thể vùi. Lượng thể vùi này được hòa tan trong 220 ml dung dịch hòa tan N-lauroylsarcosine 0,2% (theo tỷ lệ 1g thể vùi : 50ml dung dịch hòa tan). Các mẫu sinh khối tế bào, thể vùi trước hòa tan, dịch nổi sau hòa tan chứa protein tan, phần cặn chứa những protein không hòa tan sau khi ly tâm được phân tích bằng điện di SDS-PAGE. Kết quả điện di được trình bày trong hình 1 cho thấy, sau 20 h lên men có sự

biểu hiện vượt mức protein có kích thước 18,8 kDa tương ứng với kích thước của hG-CSF. Đồng thời kết quả hòa tan thể vùi cho thấy trong dịch nổi sau hòa tan có chứa một lượng lớn protein hG-CSF. Nồng độ hG-CSF trong dịch hòa tan được xác định dựa trên đường chuẩn RP-HPLC (tương quan giữa nồng độ hG-CSF và diện tích đỉnh hấp phụ) thu được là 150µg/ml. Điều này cho thấy chúng tôi đã lên men và biểu hiện thành công hG-CSF ở dạng thể vùi không điển hình và thể vùi này có khả năng hòa tan cao để thu nhận protein hG-CSF dạng tan. Hiệu suất lên men đạt 33,04 mg hG-CSF/L.

Tinh chế hG-CSF bằng sắc ký cở định ion IMAC

Nhiều nghiên cứu cho thấy protein hG-CSF dùng cấu hình sẽ biểu hiện một số histidine trên bề mặt. Do đó nếu protein hG-CSF có cấu hình đúng sẽ có khả năng liên kết ái lực với Ni^{2+} -NTA của cột HisTrap FF trong quá trình tinh chế IMAC. Dịch sau hòa tan thể vùi lên men được đổi dung môi sang dung dịch cân bằng cột bằng phương pháp lọc tiếp tuyến, sau đó được tinh chế bằng phương pháp IMAC. Trong quá trình ly giải chúng tôi thu được một đỉnh hấp phụ duy nhất, thể tích dung dịch chứa hG-CSF thu nhận được là 4 ml. Phần dịch thu được trong bước ly giải này được phân tích bằng điện di SDS-PAGE cùng với mẫu ban đầu trước khi qua cột và dung dịch ra khỏi cột trong quá trình nạp mẫu. Kết quả điện di được trình bày ở Hình cho thấy phần lớn các protein tạp không có khả năng bám trên cột và ra khỏi cột trong bước nạp mẫu (giếng 3). Trong mẫu sau tinh chế xuất hiện một protein tương ứng kích thước của hG-CSF là 18,8 kDa. Độ tinh sạch của mẫu protein sau tinh chế được đánh giá sơ bộ bằng cách phân tích phần trăm protein hG-CSF có trong mẫu sau tinh chế bằng phần mềm Quantity One (Biorad, Mỹ) dựa trên kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy protein hG-CSF thu nhận được sau bước ly giải có độ tinh sạch khá cao 91,7%. Hiệu suất của quá trình tinh chế hG-CSF được đánh giá dựa trên khả năng thu hồi protein hG-CSF dùng cấu hình của quá trình tinh chế IMAC đạt 91,36%

Cấu hình và hoạt tính sinh học của protein hG-CSF sau tinh chế

Cấu hình protein hG-CSF sau tinh chế được kiểm tra bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp đảo pha RP-HPLC với đối chứng là sản phẩm thương mại Neupogen. Mẫu hG-CSF sau tinh chế và Neupogen được phân tích ở cùng điều kiện và chương trình chạy. Kết quả trên Hình 3. cho thấy mẫu

hG-CSF tái tổ hợp sau tinh chế (2) chỉ có một đỉnh hấp phụ với thời gian lưu là 26,63 trùng với thời gian lưu của mẫu Neupogen chuẩn (1). Kết quả này khẳng định mẫu hG-CSF có cấu hình tương tự như Neupogen chuẩn.

Hoạt tính sinh học của protein trong từng phần đoạn được xác định bằng thử nghiệm sinh học in vitro trên dòng tế bào M-NFS-60. Dựa vào đó thì tương quan giữa giá trị OD_{550} và log nồng độ mẫu được thể hiện ở hình 4 ta thấy mẫu hG-CSF sau tinh chế có phương thức tác động lên tế bào M-NFS-60 tương tự như mẫu chuẩn Neupogen. Kết quả phân tích bằng phần mềm GraphPad Prism 5.0 cũng cho thấy protein hG-CSF trong mẫu sau tinh chế có hoạt tính cao ($9,24 \times 10^7$ IU/mg) so với mẫu chuẩn Neupogen (10^8 IU/mg) và mẫu trước tinh chế ($2,49 \times 10^7$ unit/mg)

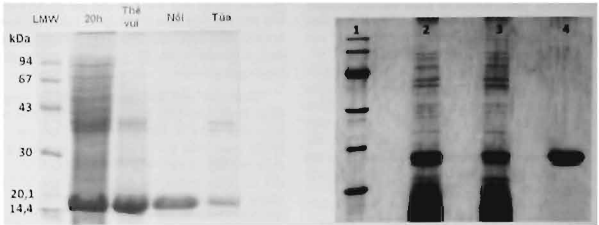
Như vậy, protein hG-CSF thu nhận được sau quá trình lên men và tinh chế có cấu hình và hoạt tính sinh học tương tự với sản phẩm thương mại Neupogen.

Quy trình sản xuất hG-CSF từ thể vùi không điển hình đạt hiệu quả thu nhận là 30,2mg hG-CSF có hoạt tính và độ tinh sạch tương đối từ 1 lít dịch lên men. Quy trình này đơn giản và ít tốn kém do protein có hoạt tính được thu nhận dễ dàng bằng cách hòa tan với dung dịch chất biến tính ở nồng độ thấp mà không cần trải qua quá trình tái gấp cuộn phức tạp. Mặt khác, do thể vùi không điển hình vẫn giữ được nhiều ưu điểm của thể vùi điển hình nên quá trình thu nhận dễ dàng, dịch hòa tan có độ đồng nhất về protein cao, nhờ đó quá trình tinh chế đơn giản hơn và đạt hiệu quả cao.

KẾT LUẬN

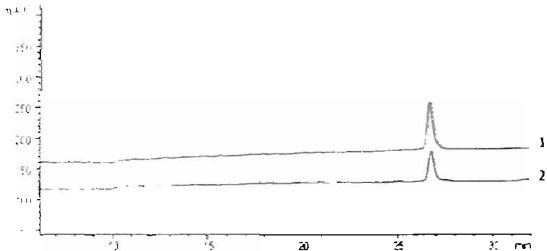
Chúng tôi đã biểu hiện, thu nhận và tinh chế thành công protein hG-CSF có hoạt tính sinh học cao. Kết quả này cho thấy quy trình sản xuất từ thể vùi không điển hình đạt hiệu quả thu nhận protein có hoạt tính cao và có nhiều thuận lợi cho việc ứng dụng sản xuất chế phẩm thuốc hG-CSF cũng như các protein được liệu khác.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được thực hiện với kinh phí từ đề tài trọng điểm quốc gia KC04-13. Chúng tôi chân thành cảm ơn các thành viên PTN CNSH-PT-A đã cộng tác và nhiệt tình hỗ trợ chúng tôi trong các thí nghiệm đồng hóa, lên men và tinh chế protein.

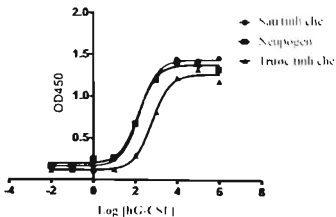


Hình 1. Kết quả biểu hiện và thu nhận hG-CSF dạng tan từ thế vùi không điển hình ở quy mô 1 lít. 1: protein tổng số của tế bào *E. coli* BL21(DE3)/pET-gcsf thu được sau khi lên men 20 giờ, 2: thế vùi thu nhận từ tế bào *E. coli* BL21(DE3)/pET-gcsf, 3: protein thu nhận được sau khi hòa tan thế vùi trong N-lauryl-sarcosine 0.2%, 4: phần protein còn lại trong pha tủa sau khi hòa tan thế vùi trong N-lauryl-sarcosine 0.2%

Hình 2. Kết quả phân tích các phân đoạn tinh chế bằng điện di SDS-PAGE. 1: Thang phân tử lượng thấp, 2: Mẫu trước khi qua cột, 3: Mẫu sau khi qua cột trong bước gắn kết, 4: Mẫu sau khi tinh chế



Hình 3. Kết quả phân tích hG-CSF sau khi tinh chế bằng RP-HPLC. 1: Mẫu protein sau tinh chế; 2: Neupogen



Hình 4. Đồ thị thể hiện mối tương quan giữa sự tăng sinh của tế bào M-NFS-60 (OD450) và log nồng độ mẫu hG-CSF

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Thị Phương Hiếu, Vương Cát Khanh, Trần Thanh Hòa, Đặng Thị Phương Thảo, Trần Linh Thuộc. Thu nhận protein hG-CSF (human granulocyte colony stimulating factor) có hoạt tính từ thể vùi non-classical ở *Escherichia coli*. Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc, Thái Nguyên 2009.

Jevsevar S, Gaberc-Porekar V, Fonda I, Podobnik B, Grdadolnik J, Menart V (2005) Production of Nonclassical

Inclusion Bodies from Which Correctly Folded Protein Can Be Extracted. *Biotechnol Prog*21(2): 632

Peternel S, Jevsevar S, Bele M, Gaberc-Porekar V, Menart V (2008) New properties of inclusion bodies with implications for biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem* 49(Pt): 239-246

Sorensen HP, Mortensen KK (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 115(2): 113-128.

EXPRESSION AND ISOLATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE hG-CSF FROM NONCLASSICAL INCLUSION BODIES PRODUCED IN *E. COLI* AT ONE-LITER SCALE

Nguyễn Thị Phương Hiếu, Lương Văn Đức, Vương Cát Khanh, Đặng Thị Phương Thảo*, Trần Linh Thuộc

University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City

SUMMARY

In *E. coli*, the formation of inclusion bodies (IBs) is commonly seen upon overexpression of recombinant proteins. The recombinant protein inside IBs is usually misfolded and a series of denaturation/renaturation steps are necessary for isolation of biologically active protein. In recent study, nonclassical inclusion bodies (nIBs) – a new subtype of IBs – containing a high percentage of correctly folded protein can be extracted under non-denaturing conditions. The absence of denaturation/renaturation step allows to develop more efficient process with lower costs and environment-friendly technologies. In our studies previously published, we have developed a simple, efficient and applicable process for extraction of biologically active hG-CSF protein without renaturation procedure required. The expression of rhG-CSF in *E. coli* BL21(DE3)/pET-gcsf was induced by 0.5mM IPTG at low temperature. The cultural medium was supplemented with isopropanol, stress causative agent. The nIBs were isolated and resuspended with 0.2% (w/v) N-lauroylsarcosine. The expression and solubilization of nIBs were confirmed by SDS-PAGE. Characterization of rhG-CSF by reverse-phase HPLC showed similar result to standard. At one-liter scale-up, 33.04 mg of bioactive hG-CSF protein per liter of cell culture were achieved. The solubilized rhG-CSF was successfully purified by IMAC (Immobilized metal ion affinity chromatography) with the yield of 91.36%. The biological activity of rhG-CSF was ascertained via proliferative assay using the murine myeloblastic M-NFS60 cell line accomplishing 9.24×10^7 IU/mg specific bioactivity with 91.7% purity.

Keywords: hG-CSF, nonclassical inclusion bodies, gene expression, M-NFS60, IMAC

* Author for correspondence: E-mail: thaodp@hcmus.edu.vn