

NHÂN DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GENE MÃ HÓA LUMBROKINASE TỪ GIUN ĐẤT *LUMBRICUS RUBELLUS* TRONG *ESCHERICHIA COLI*

Bùi Phương Linh, Chu Thị Hoa, Đỗ Thị Tuyền, Lý Thị Bích Thủy, Nguyễn Đình Thi

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Lumbrokinase là những chuỗi polypeptide đơn giản asparagine hoặc aspartic acid, rất ít proline và lysine, không chứa thành phần đường, được xếp vào loại serine protease kiềm giống trypsin. Lumbrokinase được xem là thuốc tan huyết khối đặc hiệu, có thể được sử dụng làm thuốc uống vì nó có thể được hấp thụ từ ruột vào máu và hoạt hóa hệ thống thủy phân fibrin nội sinh. Trong nghiên cứu này, gene mã hóa Lumbrokinase từ loài giun *Lumbricus rubellus* (AB045720) trên GenBank được tối ưu hóa codon. Gene *lk* có chứa 747 bp, mã hóa cho 238 amino acid. Gene được tạo dòng trong vector pET22b(+) và biểu hiện trong *E. coli* BL21(DE3)pLysE, bước đầu có hoạt tính thủy phân fibrin cao so với chuẩn plasmin (Sigma). Sau cảm ứng IPTG 1 mM, xuất hiện băng protein chiếm đến 92% protein tổng số và tăng dần ở các thời gian cảm ứng khác nhau và đạt cực đại ở 6h sau cảm ứng. Nhận dạng Maldit-ToF đã khẳng định protein biểu hiện chính là Lumbrokinase. Đây là cơ sở khoa học để tiếp tục tối ưu cũng như nghiên cứu quy trình tinh sạch Lumbrokinase tái tổ hợp đạt năng suất biểu hiện cao nhất ứng dụng vào sản xuất thuốc chống tắc nghẽn mạch máu.

Từ khóa: Biểu hiện, fibrin, *Lumbricus rubellus*, Lumbrokinase, plasminogen.

MỞ ĐẦU

Lumbrokinase (LK) được xếp vào loại serine protease kiềm giống trypsin. Tuy nhiên, chúng giàu asparagine và aspartic acid so với các serine protease khác đã biết. Lumbrokinase tách ra từ giun đất được dùng để điều trị tắc nghẽn mạch máu và bệnh tim mạch (Jin *et al.*, 2000). Lần đầu tiên nó được tách chiết và đặt tên là Lumbrokinase bởi Mihara (Mihara *et al.*, 1989). Lumbrokinase là một nhóm các enzyme thủy phân protein có khối lượng phân tử ~25-32 kDa (Cho *et al.*, 2004a) bao gồm các yếu tố hoạt hóa plasminogen và plasmin (Matsuba, 2004). Các nhà khoa học đã chứng minh rằng các enzyme này có thể sử dụng làm thuốc uống thay thế một số thuốc chữa bệnh tim mạch rất đắt trên thị trường hiện nay như urokinase và tPA (Yan *et al.*, 2010).

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về enzyme Lumbrokinase, một số nghiên cứu gần đây cho rằng các enzyme thủy phân fibrin có thể hòa tan cục máu đông và hạn chế được khả năng vón cục (Jin *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2004). Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu đều đi vào tách chiết, tinh sạch, đánh giá tính chất lý hóa và ứng dụng lâm sàng của enzyme thủy phân fibrin từ giun đất *Lumbricus rubellus*, *Lumbricus bimastus*, *Eisenia fetida* hoặc *E. andrei* (Hu *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2010). Bên cạnh đó một số các tác giả đã biểu hiện Lumbrokinase tái tổ hợp trong *E. coli*, *Pichia pastoris*,... với năng suất biểu hiện khá cao và hoạt tính đạt từ 30- 100U/ml (Xu *et al.*, 2010; Li, *et al.*, 2012). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành biểu hiện gene mã hóa Lumbrokinase từ *L. rubellus* có mã số trên Genbank (AB045720) đã được tối ưu codon hóa nhằm mục đích tạo chúng vì sinh vật tái tổ hợp có khả năng sinh tổng hợp Lumbrokinase cao, ứng dụng làm nguyên liệu thuốc chữa bệnh tắc nghẽn mạch máu.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Đoạn gene mã hóa protein LK đã nhân dòng trong pUC57 (pUC57LK). Vector pJET1.2/blunt (Fermentas, Mỹ) được dùng để tách dòng gene mã hóa Lumbrokinase ở *E. coli* chủng DH10B (Invitrogen, Mỹ) Vector pET22b(+) (Novagen, Mỹ) được dùng để biểu hiện protein tái tổ hợp ở BL21(DE3)pLysE (Invitrogen, Mỹ).

Hóa chất

Cao nấm men, peptone (Sigma, Mỹ); NdeI và XhoI, T4 ligase, Taq polymerase và GeneRuler™ 1kb DNA Ladder được mua từ hãng Fermentas (Litva); IPTG (Bioss, Canada). Mỗi được thiết kế dựa vào trình tự cDNA của LK đã công bố trên Genbank sau khi đã tối ưu codon.

pP_LK_F: 5'-GGCGGATCCCATATGATTGCTGGACCTG-3'

pP_LK_R: 5'- GCCTCGAG1TTGCTTTAGGGTTATC-3'

Phương pháp

Thiết kế vector nhân dòng

Gene *lk* được khuếch đại từ khuôn pUC57LK bằng phương pháp PCR với các cặp mồi đặc hiệu tương ứng: pP_LK_F và pP_LK_R để thiết kế chèn vào vector pJET1.2/blunt với chu trình chạy PCR: 95°C/1 phút, 30 chu kỳ (92°C/1 phút, 52°C/45 giây, 72°C/45 giây); 72°C/10 phút; 4°C/∞. Sau đó, cất sản phẩm PCR từ khuôn pUC57/LK và vector pJET1.2 bằng bluntning enzyme sau đó lại vào bằng enzyme ligase T4. Hỗn hợp tạo ra được đưa vào tế bào khả biến *E. coli* DH10B (Invitrogen) theo phương pháp sốc nhiệt để tách dòng plasmid pJET1.2 tái tổ hợp chứa đoạn gene mã hóa Lumbrokinase (pJET1.2/LK).

Thiết kế vector biểu hiện

Cắt pJET1.2/LK bằng enzyme XhoI và NdeI Sản phẩm được tinh sạch từ gel 0,8% agarose Vector biểu hiện pET22b(+) cũng được xử lý tương tự bằng hai enzyme đó và được tinh sạch từ gel 0,8% agarose. Hai sản phẩm cắt

được lai bằng enzyme T4 ligase, sau đó, hỗn hợp tạo ra được đưa vào tế bào khả biến *E. coli* DH10B (Invitrogen) để tách dòng plasmid pET22b(+) tái tổ hợp chứa đoạn gene mã hóa Lumbrakinase (pET22b+LK).

Biểu hiện

Các dòng *E. coli* BL21(DE3)pLysE mang vector tái tổ hợp pELK được nuôi cấy qua đêm ở 37°C trong 5 ml môi trường LB có chứa 100 µg/ml ampicillin. Từ dịch nuôi cấy qua đêm cấy chuyển 1 ml sang bình 500 ml chứa 100 ml LB lỏng có bổ sung 100 µg/ml ampicillin, nuôi lắc 37°C trong 3 giờ để OD₆₀₀ đạt 0,5- 0,8. Bổ sung chất cảm ứng IPTG đến nồng độ cuối cùng là 1 mM và tiếp tục nuôi lắc 200 rpm ở 37°C để cảm ứng tế bào tổng hợp protein tái tổ hợp. Tế bào được thu sau 6 giờ nuôi cấy cảm ứng bằng ly tâm 8000 vòng/phút trong 10 phút.

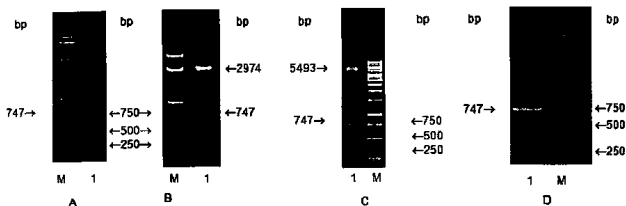
Tinh sạch LK tái tổ hợp (rLK)

rLK được tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực Ni²⁺ của Invitrogen. Dịch biểu hiện rLK được ly tâm 8000 vòng/phút trong 10 phút để thu tế bào. Tế bào sau đó được phá bằng dung dịch 6 M guanidine và tinh sạch theo phương pháp Hybrid như hướng dẫn của hệ thống tinh sạch ProBond™ Nickel-Chelating Resin (Invitrogen).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết kế vector nhân dòng

Gene mã hóa Lumbrakinase được khuếch đại từ khuôn plasmid pUC57LK bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu p_LK_F và p_LK_R. Sản phẩm PCR trên gel agarose 0,8% thể hiện một băng duy nhất có kích thước phân tử phù hợp với lý thuyết 747 bp (Hình 1A).



Hình 1. Điện di đồ sản phẩm PCR (A); Điện di đồ sản phẩm cắt pJET1.2/LK (B); Điện di đồ sản phẩm cắt pELK (C); Điện di đồ sản phẩm PCR từ khuôn pELK (D)

Sản phẩm PCR được chèn vào vector nhân dòng pJET1.2/bunt, hình thành plasmid tái tổ hợp pLK và biến nạp vào *E. coli* DH5α bằng phương pháp sốc nhiệt. Các khuẩn lạc được nuôi cấy để tách plasmid. Plasmid tái tổ hợp có kích thước lớn hơn pJET1.2 do đó có khả năng mang gene chèn (không dẫn số liệu). DNA ngoại lai được thiết kế hai điểm cắt *Nde*I và *Xho*I ở hai đầu. Sản phẩm cắt plasmid tái tổ hợp bằng *Nde*I và *Xho*I cho một băng DNA tương ứng với kích thước của gene *lk* (747 bp) và một băng tương ứng với kích thước của pJET1.2 (2974 bp) (Hình 1B). Như vậy gene *lk* đã được nhân dòng trong pJET1.2

Thiết kế vector biểu hiện

pJET1.2/LK và vector pET22b(+) được cắt với *Nde*I và *Xho*I và tinh sạch bằng kit Agarose Gel Purification. Gene *lk* sau khi được tinh sạch sẽ được chèn vào vector pET22b(+) bằng enzyme ligase T4. Sản phẩm lai được biến nạp vào *E. coli* DH10B và chọn dòng. Các plasmid tái tổ hợp sau khi chọn dòng được cắt kiểm tra bằng *Nde*I và *Xho*I. Dòng plasmid pELK (Hình 1C, giếng 1) có hai băng DNA, một băng có kích thước khoảng 5493 bp và một băng có kích thước khoảng 747 bp (lần lượt tương ứng với kích thước vector pET22b(+) và gene *lk*). Kết quả kiểm tra PCR với khuôn plasmid tái tổ hợp cũng cho thấy sản phẩm PCR đặc hiệu với một băng kích thước khoảng 747 bp tương ứng với đoạn gene *lk* chèn vào (Hình 1D, giếng 1). Plasmid pELK sau đó được đọc trình tự để kiểm tra cấu trúc biểu hiện trước khi biểu hiện trong *E. coli* BL21(DE3)pLysE.

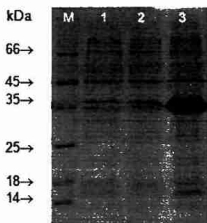
Kết quả đọc trình tự pELK cho thấy có một bộ ba kết thúc TGA (1) của vector nằm sau đuôi 6xhis. Trong quá trình dịch mã, sự dịch mã sẽ kết thúc khi gặp bộ ba kết thúc, do đó protein tạo thành sẽ mang đuôi 6xhis. Điều này sẽ rất thuận lợi cho việc tinh sạch protein tái tổ hợp khi biểu hiện trong *E. coli* BL21. Sử dụng phần mềm DNASTar phân tích cho kết quả đoạn gene *lk* có chiều dài 747 bp, mã hóa cho protein gồm 249 amino acid, có trình tự tương đồng 100% với gene mã hóa cho Lumbrakinase đã được đăng kí trong GenBank (AB045720). Cấu trúc biểu hiện của pELK đã đúng khung đọc như trình toán ban đầu (Hình 2), đủ điều kiện để đưa vào biểu hiện trong *E. coli* BL21(DE3)pLysE.

AGATCTCGAT	CCCGCGAAAT	TAATACGACT	CACATATAGG	GAATTGTGAG	CGGATAACAA	TTCC CCCTCTA	70
Yếu tố điều khiển T7							
GAAATAATTT	TGTTAACTT	TAAGAAGGAG	ATATACATAT	GATCGTTGGC	GGTATTGAAG	CGCGTCCGTA	140
Điểm cắt NdeI							
TGAATTCGG	TGGCAAGTCA	CGGTCGCGCG	CAAAATCAAGC	GATTCTCATT	TTTGCGGGCG	TAGCATTATC	210
AACGACCGTT	GGGTGGTTTG	CGGACGACAC	TGATGTCAGG	GTGAAGCACC	GGCACTGGTT	TCGCTGGTCG	280
TGGGTGAACA	TGATCGTAGT	GCAGCTTCCA	CCGTGCGCCA	AACGCATGAT	GTGGACTCCA	TTTTTGTTC	350
CGAAGATTAT	AACGCGAATA	CCCTGGAAAA	TGACGTTAGT	GTCAATAAAA	CCTCCGTCGC	CATTACGTTT	420
GATATCAACG	TGGGTCCGAT	CTGCGCACCG	GATCCGGGTA	ATGACTATGT	TTACCGTAAA	TCACAGTGT	490
CGGGCTGGGG	TACCATTAAC	AGCGGCGGTA	TCCTGCTGCC	GAATGTGCTG	CGCTAGCTTA	CGCTGAACGT	560
CACCCAGAA	CAATTTTGG	AAGATGGTGA	TCCGCTGAAC	TCCATTTCAG	ATGACATGAT	CTGGCGCATCA	630
GATAACACCG	CGCGTAATGA	TCGCGACTCA	TGTCAGGGTG	ATTCGGGCGG	TCCGCTGAGC	GTTAAAAGACG	700
GCAGCGGTAT	TTTCTCTCTG	ATTGGCATCG	TCTCTTGGGG	CATCGGTTGT	CGCAGTGGTT	ATCCGGGCGT	770
TTATCCCGCG	GTCGGCTTTC	CGCTGCGGTG	GATTACGGAC	ATTATTACCA	ACAACCTCGA	GGCTGCTGCC	
Điểm cắt XhoI Đuôi his							
GCACCAACAC	CACCAACACT	GAGATCCGGC	TGCTAACAAA	GCCTGAAAGG	AAGCTGAGTT	ACCGCTGAGC	910
(1)							
Yếu tố kết thúc T7							
ATAACTAGC	ATAACCCCTT	GGGGCCCTCTA	AACGGGCTCT	GAGGGGTTTT	TGT	963	

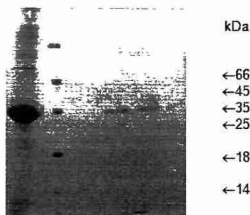
Hình 2. Trình tự nucleotide và amino acid suy diễn đoạn gene mã hóa Lumbrokinase

Biểu hiện LK tái tổ hợp

Sau khi cấu trúc biểu hiện đã kiểm tra đúng khung đọc. Plasmid tái tổ hợp pELK được biến nạp vào *E. coli* BL21(DE3)pLysE theo phương pháp sốc nhiệt tạo thành các dòng tái tổ hợp pELK. Tiến hành tối ưu hóa các điều kiện biểu hiện: nhiệt độ, nồng độ chất cảm ứng IPTG và thời gian thu mẫu của chúng tái tổ hợp sinh tổng hợp Lumbrokinase. Kết quả cho thấy, điều kiện tối ưu biểu hiện LK là ở 37°C, 1 mM IPTG và sau 6 giờ cảm ứng. Kết quả điện di protein tổng số của các mẫu tế bào sau khi được cảm ứng bằng IPTG ở hình 3A thấy xuất hiện một băng protein có kích thước phân tử khoảng 35 kDa (giếng 3) so với mẫu tế bào chỉ chứa vector pET22b(+) không mang gene *lk* (giếng 1), và mẫu tế bào không được cảm ứng IPTG (giếng 2). Sử dụng phân mềm phân tích số liệu Dolphin 3D phân tích mức độ biểu hiện của protein tái tổ hợp rLK đạt 91,4 % protein tổng số (không dẫn số liệu).



Hình 3. Điện di đồ SDS-PAGE protein (1: Protein tổng số tế bào biểu hiện *E. coli* BL21(DE3)pLysE có pET không mang gene *lk* tại thời điểm 6 giờ sau cảm ứng; 2: Protein biểu hiện ở 0 giờ; 3: Protein biểu hiện ở 6 giờ sau cảm ứng IPTG; M: Marker (Fermentas))



Hình 4. Điện di đồ sản phẩm tinh sạch protein (1: Dịch protein trước khi lên cột; 2-5: Protein tinh sạch ở các phân đoạn từ 1-4; M: Marker (Fermentas))

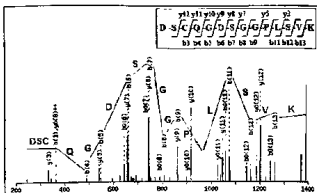
Hầu hết protein tái tổ hợp đã được biểu hiện ở *E. coli* ở dạng thể vùi không tan. rLK được thiết kế gắn thêm 6 histidine ở đầu N, vì thế, protein tái tổ hợp có thể tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực một cách dễ dàng. rLK được tinh sạch theo phương pháp Hybrid như hướng dẫn của hệ thống tinh sạch ProBond™ Nickel-Chelating Resin (Invitrogen). Sau khi sạch, LK tái tổ hợp có độ tinh sạch cao (Hình 4, giếng 3,4,5).

Xu hướng biểu hiện protein tái tổ hợp ở thể vùi trong tế bào *E. coli* khá phổ biến. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với một số nghiên cứu trên thế giới. Xu và cộng sự (2010) đã thiết kế và biểu hiện thành công đoạn peptide tuần hoàn của gene LK P1239 trong *E. coli*. Tác giả đã nhân dòng và đưa vào vector biểu hiện pET22b(+). Lumbrokinase tái tổ hợp đã được biểu hiện ở dạng thể vùi (Xu, et al., 2010). Li và cộng sự (2012) cho rằng khi biểu hiện gene *CST1* từ *Eisenia fetida*, *CST1* được biểu hiện dưới dạng thể vùi trong *E. coli* BL21(DE3). Khối lượng phân tử của *CST1* tái tổ hợp 25 kDa và Lumbrokinase tái tổ hợp khẳng định lại bởi phân tích Western Blot. Protein *CST1* tái tổ hợp tinh sạch có độ sạch đạt 95% và hiệu suất tinh sạch hơn 50% (Li, et al., 2012).

Protein tinh sạch có kích thước phân tử 35kDa được cắt ra, loại thuốc nhuộm và thủy phân bằng trypsin. Các thành phần peptide của dung dịch thủy phân được phân tách theo điện di hai chiều. Kết quả ghi phổ khối LC-MS/MS và phổ TOF MS tại phút 18,2. Phần mềm BioAnalyst QS nhận biết và chọn ion phân tử có giá trị m/z 704,189 để làm MS liên tục trong 3 giây (Hình 5).

Toàn bộ phổ MS/MS thu được từ phân tích nano LC-MS/MS của protein tìm kiếm tổng hợp bằng phần mềm Mascot v 1.8 trên NCBI nr. Kết quả phân tích tất cả các phổ MS/MS trên cơ sở dữ liệu NCBI nr đã chỉ ra 28 trình tự protein khác nhau có điểm số trong tìm kiếm bằng Mascot lớn hơn > 57 đảm bảo sự tương đồng của các phổ thực nghiệm và lý thuyết có ý nghĩa $p < 0,05$.

Kết quả Hình 5 cho thấy đoạn phổ với ghi chú DSCQSGGGLSVK tương ứng với trình tự axit amin: Asp Ser Cys Gln Gly Ser Gly Gly Pro Leu Ser Val Lys hoàn toàn giống với trình tự axit amin suy diễn của gene lk từ vị trí nucleotide 544 đến 583 (sau ATG): ACTCATGTCAGGGTGATTCGGGCGTGCCGCTGAGCGTTAAA. Kết quả BLAST trên ngân hàng Genbank cũng cho thấy protein biểu hiện có sự tương đồng lớn nhất với trình tự gene mã hóa Lumbrokinase từ *L. rubellus* có mã số trên Genbank gi1236194. Như vậy có thể khẳng định protein biểu hiện chính là Lumbrokinase.



Hình 5. Kết quả đọc trình tự MALDI TOF khối phổ đồng vị của chuỗi peptide DSCQSGGGLSVK

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thiết kế biểu hiện thành công Lumbrokinase tái tổ hợp ở *E. coli*. Lumbrokinase tái tổ hợp sinh tổng hợp cao nhất từ chủng *E. coli* BL21(DE3)pLysE ở thời gian nuôi ở 37°C, sau 6 giờ cảm ứng IPTG ở nồng độ 1 mM. Protein tái tổ hợp có mức độ biểu hiện cao đạt 92% so với protein tổng số. Lumbrokinase tái tổ hợp được tinh sạch bằng cột ái lực Ni²⁺-Resin có hiệu suất tinh sạch đạt 52%. Nhân dạng MALDI-TOF cho thấy protein biểu hiện có sự tương đồng cao với gene mã hóa Lumbrokinase có mã số Genbank gi1236194.

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện với nguồn kinh phí hỗ trợ từ chương trình "Nghiên cứu phát triển và ứng dụng công nghệ Sinh học", Bộ Khoa học và Công nghệ, giai đoạn 2012 – 2014 (đề tài "Nghiên cứu quy trình công nghệ sản xuất Lumbrokinase tái tổ hợp làm thuốc phòng chống tắc nghẽn mạch máu").

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cho H, Choi ES, Lim HG, Lee HH (2004a). Purification and characterization of six fibrinolytic serine-proteases from earthworm *Lumbricus rubellus* II. *J Biochem Mol Biol* 37: 199-205.
- Dong GQ, Yuan XL, Shan YJ, Zhao ZH, Chen JP, Cong YW (2004). Molecular cloning and characterization of cDNA encoding fibrinolytic enzyme-3 from earthworm *Eisenia foetida*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 36: 303-308.
- Hu R, Zhang S, Liang H, Li N, Tu C (2004). Codon optimization, expression, and characterization of recombinant Lumbrokinase in goat milk. *Protein Expr Purif* 37: 83-88.
- Jin L, Jin H, Zhang G, Xu G (2000). Changes in coagulation and tissue plasminogen activator after the treatment of cerebral infarction with Lumbrokinase. *Clin Hemorheol Microcirc* 23: 213-218.
- Li C, Wang KY, Li D, Wang N, Liu D (2012). Cloning, expression and characterization of a gene from earthworm *Eisenia fetida* encoding a blood-clot dissolving protein. *PLoS One* 7: e53110.
- Matsuba S (2004). Complementary and alternative approaches to biomedicine Evid. Based Complement Altern Med 1: 345-348.
- Mihara H, Yoneta T, Sumi H, Soeda M, Maruyama M (1989). A possibility of earth worm powder as therapeutic agent for thrombosis *Thromb Haemost*: 52: 545-549.
- Xu ZR, Yang YM, Gui QF, Zhang LN, Hu L (2010). Expression, purification, and characterization of recombinant Lumbrokinase Pl239 in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 69(2): 198-203.
- Yan XM, Kim CH, Lee CK, Shin JS, Cho H, Sohn UR (2010). Intestinal Absorption of Fibrinolytic and Proteolytic Lumbrokinase Extracted from Earthworm, *Eisenia andrei*. *Korean J Physiol Pharmacol* 14: 71-75.
- Yuan X, Cao C, Shan Y, Zhao Z, Chen J, Cong Y (2006). Expression and characterization of earthworm *Eisenia foetida* Lumbrokinase-3 in *Pichia pastoris*. *Prep Biochem Biotechnol* 36: 273-279.

CLONING AND EXPRESSION OF LUMBROKINASE GENE FROM EARTHWORM LUMBRICUS RUBELLUS IN ESCHERICHIA COLI

Bui Phuong Linh, Chu Thi Hoa, Do Thi Tuyen, Ly Thi Bich Thuy, Quyen Dinh Thi*
Institute of Biotechnology, VAST

SUMMARY

Lumbrokinase (LK) are single polypeptide chains rich in asparagine or aspartic acid but low in proline and lysine. The enzymes classified as trypsin-like serine protease do not contain sugar components. Lumbrokinase have been studied as a specific