TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN hIGF-1 (HUMAN INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 1) TRONG *E. coli*

Dương Long Duy, Đặng Thị Phương Thảo*, Trần Linh Thuớc

Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG tp. Hồ Chí Minh, (*)thaodp@hcmus.edu.vn

TÓM TẮT: hIGF-1 (human Insulin-like Growth Factor 1) là nhân tố tăng trưởng do gan tiết ra dưới sự kích thích của hormone tăng trưởng GH. hIGF-1 được chỉ định để điều trị bệnh lùn ở trẻ do thiếu hụt hIGF-1 và được sử dụng để kích thích sự phát triển khối lượng cơ ở các vận động viên thể dục thể thao. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, hIGF-1 có khả năng kiểm soát lượng glucose trong máu ở bệnh nhân đái tháo đường type 1 và type 2, có tác động tích cực đến một số bệnh thần kinh như bệnh alzheimer, một số bệnh tim mạch và nhiều nghiên cứu ứng dụng chức năng của hIGF-1 vẫn đang được tiến hành. Với mục tiêu thu nhận lượng lớn hIGF-1 nhằm mục đích phục vụ điều trị bệnh và nghiên cứu, nhóm chúng tôi tiến hành sản xuất rhIGF-1 trên hệ thống tế bào vi khuẩn *E. coli*. Đầu tiên, chúng tôi tiến hành tạo dòng và biểu hiện protein hIGF-1. Gen mã hóa cho hIGF-1 được gắn chèn vào plasmid pET-22b để tạo thành plasmid pET22b-IGF1. Vector tái tổ hợp được kiểm tra bằng các phương pháp PCR, enzyme cắt giới hạn và giải trình tự. Plasmid pET22b-IGF1 được biến nạp vào chủng tế bào *E. coli* Origami (DE3) để biểu hiện protein mục tiêu. Protein rhIGF-1 được cảm ứng biểu hiện bằng IPTG, kết quả SDS-PAGE và Western blot cho thấy có vạch protein rhIGF-1 trên bản điện di và trên bản phim. Chúng tôi đã biểu hiện thành công rhIGF-1 trong tế bào *E. coli*. Kết quả này là cơ sở để chúng tôi tiếp tục phát triển nghiên cứu các bước tiếp theo gồm lên men, tinh chế và kiểm tra hoạt tính rhIGF-1 thu nhận được.

Từ khóa: *E. coli*, protein tái tổ hợp, rhIGF-1.

MỞ ĐẦU

Human Insulin-like Growth Factor 1 (hIGF-1) là nhân tố tăng trưởng có bản chất protein, có cấu trúc không gian gần giống với phân tử insulin với độ tương đồng trình tự lên đến 50%. hIGF-1 gồm một chuỗi 70 amino acid, chứa 3 cầu nối disulfide nội phân tử (Cys47-Cys52, Cys6-Cys48, Cys18-Cys61) với trọng lượng phân tử 7469 dalton [3, 5, 6]. hIGF-1 được tiết ra chủ yếu bởi gan dưới sự kích thích của hormone tăng trưởng GH (Growth Hormone) [1], có vai trò kích thích sự tăng trưởng và phát triển hầu hết các loại tế bào trong cơ thể đặc biệt là các tế bào cơ xương, tế bào gan, tế bào thần kinh, tế bào da và tế bào tạo máu. Bên cạnh đó hIGF-1 còn giúp tăng cường quá trình tổng hợp DNA, tổng hợp protein, cân bằng các chu trình chuyển hoá lipid, carbohydrate [1, 3]. hIGF-1 được tiết ra và lưu thông trong máu luôn được gắn với một trong 6 loại protein chuyên biệt khác là IGF-1 Binding Protein (IGFBP) trong đó IGFBP-3 chiếm tỉ lệ cao nhất lên đến 90%. Khi được gắn với IGFBP, hIGF-1 không có hoạt tính sinh học, do đó các phân tử IGFBP có vai trò điều tiết hoạt động hIGF-1 trong cơ thể. hIGF-1 theo máu và đến tác động lên các tế

bào đích thông qua thụ thể chuyên biệt IGF1R (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor) thuộc họ Tyrosine Kinase. hIGF-1 gắn vào IGF1R, dẫn đến hoạt hóa con đường truyền tín hiệu nội bào làm kích thích quá trình sinh tổng hợp protein của tế bào đích, đồng thời ức chế quá trình apoptosis. Bên cạnh đó, việc hoạt hóa IGF1R còn làm kích hoạt con đường tín hiệu dẫn đến hoạt hóa phiên mã, làm tế bào đích tăng sinh và biệt hóa [3]. hIGF-1 đóng vai trò quan trọng trong quá trình tăng trưởng và phát triển tầm vóc ở trẻ mới lớn và trong các quá trình đồng hóa ở người trưởng thành. hIGF-1 được chỉ định điều trị cho người mắc hội chứng lùn do thiếu hụt IGF-1 (primary severe IGF-1 Deficiency) [8]. Bên cạnh đó, hIGF-1 đã được chứng minh là có tác dụng thúc đẩy sự kiểm soát nồng độ glucose trong máu ở bệnh nhân đái tháo đường loại 1 và loại 2 [4, 7]. Ngoài ra, nó cũng còn có tác dụng tích cực khi điều trị một số bệnh thần kinh, bệnh tim mạch, bệnh cơ xương... [2, 7]. hIGF-1 còn được sử dụng làm nhân tố kích thích tăng khối lượng cơ ở các vận động viên thể dục thể thao [9]. Nhiều nghiên cứu ứng dụng chức năng của hIGF-1 vẫn đang được tiến hành.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tạo dòng và biểu hiện protein hIGF-1 trong hệ

thống *Escherichia coli* với mục tiêu bước đầu xây dựng quy trình sản xuất hIGF-1 tái tổ hợp nhằm phục vụ nhu cầu nghiên cứu và điều trị.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng vi sinh vật và plasmid

Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α [*F- endA1 hsdR17 (rk-/mk-) supE44 thi λ -recA1 gyrA96 Δ lacU169 (ϕ 80 *lacZ* Δ M15)] (Takara) được sử dụng làm chủng chủ để tạo dòng và lưu trữ plasmid tái tổ hợp. Chủng vi khuẩn *E. coli* Origami (DE3) [Δ (ara-leu) 7697 Δ lacX74 Δ phoA PvuII *phoR* araD139 *ahpC* *galE* *galK* *rpsL* F'[*lac⁺lacI^q* pro] (DE3) *gor522*: Tn 10 *trxB* (Kan^R, Str^R, Tet^R)⁴] (Novagen) được sử dụng làm chủng chủ để tạo dòng và biểu hiện protein đích dưới sự cảm ứng của IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). Plasmid pIGF-1 được tổng hợp tại công ty IDT Co. (Hoa Kỳ) có mang trình tự gen *higf-1* mã hóa cho protein hIGF-1 theo thiết kế. Plasmid pET-22b (Novagen) có kích thước 5493 bp, được dùng để thiết kế vector biểu hiện hIGF-1 dưới sự kiểm soát của promoter T7 và có mang gen kháng kháng sinh ampicillin dùng để sàng lọc thể biến nạp. Các chủng *E. coli* và plasmid được cung cấp bởi Phòng thực nghiệm Công nghệ sinh học thân tử, Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG tp. Hồ Chí Minh.*

Phương pháp

Thu nhận gen đích bằng phản ứng PCR

Phản ứng PCR thu nhận gen *higf-1* từ plasmid pIGF-1 được tiến hành với cặp mồi đặc hiệu có mang trình tự nhận biết của enzyme cắt hạn chế *NdeI* ở đầu 5' và *BamHI* ở đầu 3' nhằm khuếch đại đoạn gen đích dài 233bp: 5'-AC TCATATGGGACCGGAAA-3' (*higf1*-F) và 5'-T AGGATCCCTATTAGGCGGAT-3' (*higf1*-R). Chương trình phản ứng PCR bao gồm 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm một bước biến tính ở 94°C trong 30 giây, một bước bắt cặp ở 51°C trong 30 giây và một bước kéo dài ở 72°C trong 30 giây; cuối phản ứng là một bước kéo dài 7 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%.

Thiết lập vector tái tổ hợp pET22b-IGF1 có mang gen higf-1

Sản phẩm PCR được cắt bằng cặp enzyme cắt giới hạn *NdeI* và *BamHI* (Fermentas) và tinh chế qua cột EZ-10 (Biobasic Inc., Canada). Sản phẩm cắt được nối vào vector biểu hiện pET-22b đã được cắt mở vòng cũng bằng hai enzyme này bằng enzyme T4 DNA ligase (Fermentas). Vector tái tổ hợp tạo thành được đặt tên là pET22b-IGF1 và được biến nạp vào chủng tế bào *E. coli* DH5 α bằng phương pháp CaCl₂ lạnh (sốc nhiệt) [10]. Huyền phù tế bào sau biến nạp được trải trên môi trường LB agar (Tryptone 1%, yeast extract 0,5%, NaCl 0,5%, agar 2%) bổ sung ampicillin đạt nồng độ cuối 100 μ g/ml (LBA-Amp100) và ủ ở 37°C trong khoảng 16-18 giờ.

Sàng lọc thể biến nạp và giải trình tự DNA

Thể biến nạp mọc được trên môi trường LBA-Amp100 được sàng lọc bằng phương pháp PCR khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu cho gen *higf-1*. Thu nhận các khuẩn lạc cho phản ứng PCR dương tính và tách plasmid bằng phương pháp SDS kiềm [10]. Plasmid thu nhận được kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mồi T7 promoter và T7 terminator (Novagen) theo chương trình gồm 30 chu kỳ (mỗi chu kỳ gồm 1 bước biến tính ở 94°C trong 45 giây, một bước bắt cặp ở 50°C trong 45 giây và một bước kéo dài ở 72°C trong 45 giây, cuối phản ứng là một bước kéo dài 7 phút ở 72°C) và bằng phản ứng cắt giới hạn với hai enzyme *NdeI* và *BamHI*. Sản phẩm PCR và sản phẩm cắt được điện di trên gel agarose 1% và so sánh với thang chuẩn DNA 1kb plus (Fermentas) để kiểm tra kích thước. Những plasmid thu được từ các dòng tế bào tái tổ hợp sau khi được cắt bằng *NdeI* và *BamHI* cho hai vạch tương ứng với kích thước của plasmid ban đầu và gen đích sẽ được giải trình tự ở công ty Macrogen (Hàn Quốc). Trình tự thu nhận được so sánh với trình tự lý thuyết bằng phần mềm Jellyfish version 3.1.1.

Biểu hiện protein hIGF-1

Tiến hành biến nạp plasmid pET22b-IGF1 vào dòng tế bào *E. coli* Origami (DE3). Các khuẩn lạc mọc được trên môi trường LBA-Amp100 được sàng lọc bằng phương pháp PCR khuẩn lạc với cặp mồi T7 promoter và T7 terminator. Chọn khuẩn lạc dương tính với phản ứng PCR để cấy hoạt hóa vào ống nghiệm

chứa 5ml môi trường LB-Amp100, lắc 250 vòng/phút ở 37°C qua đêm. Sau đó cấy chuyển vào bình tam giác 100 ml có chứa 30ml môi trường LB Amp100 và lắc 250 vòng/phút ở 37°C cho đến khi OD₆₀₀ đạt 0,8-1 thì bổ sung IPTG đến nồng độ cuối là 0,5 mM và tiếp tục nuôi lắc thêm 6 giờ. Thu và rửa sinh khối tế bào, huyền phù tế bào trong dung dịch đệm (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM), đặt trong đá 10 phút rồi tiến hành phá tế bào bằng máy Ultrasonic Cell Disruptor (Hoa Kỳ). Dịch phá tế bào được ly tâm 13000 vòng/phút 4°C trong vòng 5 phút để thu nhận các mẫu protein nổi và tủa.

Phân tích Tricine SDS-PAGE và lai western

Các mẫu protein thu được sau khi phá tế bào sẽ được xử lý với dung dịch nạp mẫu 2X (100 mM Tris-HCl, 24% glycerol, 8% SDS, 0,2M DTT, 0,02% Coomassie Brilliant Blue G-250) và tiến hành điện di Tricine SDS-PAGE với nồng độ gel polyacrylamide là 16,5% [11]. Protein sau khi điện di được chuyển lên màng lai HybondTM (Amersham) và thực hiện lai western với kháng thể đơn dòng kháng hIGF-1(R&D Systems, Hoa Kỳ) và phát hiện nhờ kháng thể kháng IgG của chuột cộng hợp với horseradish peroxidase HRP (Abcam). Làm hiện phim bằng bộ Kit ECL (Amersham).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thu nhận gen *higf-1*

Gen *higf-1* được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% cho một vạch có kích thước khoảng 233 bp (hình 1A, giếng 2) tương ứng với kích thước gen *higf-1* như đã thiết kế theo lý thuyết. Như vậy, cặp mồi đặc hiệu do chúng tôi thiết kế có thể dùng để thu nhận trình tự gen đích có kích thước đúng như trình tự lý thuyết. Sản phẩm PCR sau đó được cắt bằng hai enzyme *NdeI* và *BamHI* để chuẩn bị cho việc tạo dòng vào vector biểu hiện.

Tạo vector tái tổ hợp pET22b-IGF1 mang gen *higf-1*

Sản phẩm khuếch đại gen *higf-1*/*NdeI* và *BamHI* được tinh chế và nối vào plasmid pET-

22b đã được cắt mở vòng với cùng cặp enzyme *NdeI* và *BamHI*. Hỗn hợp sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5α bằng phương pháp hóa biến nạp (sốc nhiệt) và sàng lọc bằng môi trường LBA-Amp100. Các khuẩn lạc mọc được trên môi trường LBA-Amp100 được sàng lọc để tuyển chọn dòng *E. coli* DH5α có mang plasmid tái tổ pET22b-IGF1 mong muốn bằng phương pháp PCR khuẩn lạc, cắt giới hạn và giải trình tự DNA. Kết quả PCR khuẩn lạc bằng cặp mồi đặc hiệu cho gen *higf-1* trên gel agarose 1% (hình 1A, giếng 3) cho một vạch có kích thước khoảng 233 bp tương ứng với kích thước gen *higf-1* (hình 1A, giếng 2). Tiến hành tách chiết plasmid từ các khuẩn lạc dương tính với phản ứng PCR. Khi được cắt mở vòng bằng cặp enzyme *NdeI* và *BamHI* (hình 1A, giếng 6), plasmid tái tổ hợp pET22b-IGF1 cho một vạch có kích thước khoảng 5400 bp tương ứng với plasmid pET-22b được cắt mở vòng bằng *NdeI* và *BamHI* (hình 1A, giếng 5) và một vạch có kích thước 225 bp tương ứng với gen *higf-1*.

Kết quả PCR plasmid pET22b-IGF1 với cặp mồi T7 promoter/T7 terminator cho một vạch (hình 1B, giếng 4) có kích thước khoảng 443 bp lớn hơn kích thước gen *higf-1* (233 bp), chứng tỏ plasmid có mang gen *higf-1*. Vì nếu không mang gen *higf-1* thì kết quả PCR sẽ chỉ cho một vạch có kích thước khoảng 309 bp (là đoạn DNA từ vùng đầu đến vùng cuối của vùng MCS trên plasmid pET-22b) (hình 1B, giếng 3). Kết quả PCR plasmid pET22b-IGF1 với cặp mồi *higf1-F*/T7 terminator cho kích thước khoảng 355 bp (hình 1B, giếng 5) tương ứng với kích thước của gen *higf-1* cộng với kích thước đoạn DNA vùng cuối của vùng MCS trên plasmid pET22b. Như vậy, plasmid thu nhận được là plasmid pET22b có gắn gen *higf-1*.

Vector tái tổ hợp pET22b-IGF1 được kiểm tra thêm một lần nữa bằng phương pháp giải trình tự DNA. So sánh kết quả giải trình tự với trình tự gen *higf-1* theo thiết kế cho thấy có sự tương đồng 100% (hình 2). Gen *higf-1* được gắn chèn đúng vào vị trí của enzyme *NdeI* và có sự đồng khung dịch mã. Như vậy, chúng tôi đã thành công trong việc thiết kế vector pET22b-IGF1 dùng để biểu hiện protein hIGF-1.

Hình 1. Kết quả điện di phân tích plasmid tái tổ hợp pET22b-IGF1

(A): 1. Thang DNA 1kb plus; 2. Sản phẩm PCR thu nhận gen *higf-1* từ plasmid pIGF1; 3. Sản phẩm PCR khuẩn lạc DH5α/pET22b-IGF1; 4. Plasmid pET22b-IGF1; 5. Plasmid pET22b/*NdeI* và *BamHI*; 6. Plasmid pET22b-IGF1/*NdeI* và *BamHI*; 7. Sản phẩm PCR plasmid pET22b-IGF1; 8. Sản phẩm PCR plasmid pET22b (chứng âm).

(B): 1. Thang DNA 1kb plus; 2. Gen *higf-1*; 3. Sản phẩm PCR pET22b với cặp mồi T7 promoter/T7 terminator; 4. Sản phẩm PCR pET22b-IGF1 với cặp mồi T7 promoter/T7 terminator; 5. Sản phẩm PCR pET22b-IGF1 với cặp mồi *higf1-F*/T7 terminator.

	1	11	21	31	41	RBS	51	<i>NdeI</i>	61	71
pET22b-IGF1	AAATCAGAGGTAAATTCCTCTATAATATTTTGTGTTACTTTAACAAGGAGATATACATATGGGACCGGAAATTCGTGTGG									
<i>higf-1</i>	-----								ATGGGACCGGAAATTCGTGTGG	
Consensus									atgggacccggaattctgtgtgg	
								Start codon		
	81	91	101	111	121	131	141	151		
pET22b-IGF1	GGCCGAGCTGGTAGACGCATTACAGTTTGTGTGCGGCGATCGGGGTTTTTATTTTAAACAGCCAACAGGATATGGGTCCT									
<i>higf-1</i>	GGCCGAGCTGGTAGACGCATTACAGTTTGTGTGCGGCGATCGGGGTTTTTATTTTAAACAGCCAACAGGATATGGGTCCT									
Consensus	ggccgagctggtagacgcattacagtttgtgtgcgcgatcgggggtttttatttttaacaagccaacaggatattgggtcct									
	161	171	181	191	201	211	221	231		
pET22b-IGF1	CTTCACGTCGCGCCCCCAGACAGGTATTGTTGATGAGTGCTTCCGCTCCTGTGACCTGCGTAGACTCGAAATGTAT									
<i>higf-1</i>	CTTCACGTCGCGCCCCCAGACAGGTATTGTTGATGAGTGCTTCCGCTCCTGTGACCTGCGTAGACTCGAAATGTAT									
Consensus	cttcacgtcgcgccccccagacaggtattgttgatgagtgcttccgctcctgtgacctgcgtagactcgaaatgtat									
	241	251	261	271	281	291	301	311		
pET22b-IGF1	TGCGCTCCGCTCAAACCTGCGAAATCCGCCTAATAGGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCG									
<i>higf-1</i>	TGCGCTCCGCTCAAACCTGCGAAATCCGCCTAA-----									
Consensus	tgcgctccgctcaaacctgcgaaatccgcctaa									
								Stop codon		

Hình 2. Kết quả giải trình tự plasmid tái tổ hợp pET22b-IGF1

Biểu hiện protein hIGF-1 trong tế bào *E. coli* Origami

Plasmid pET22b-IGF1 được biến nạp vào

chủng tế bào *E. coli* Origami (DE3). Các thể biến nạp được sàng lọc trên môi trường LBA-Amp100 và kiểm tra lại bằng PCR khuẩn

lạc với cặp mồi T7 promoter/T7 terminator. Khuẩn lạc cho kết quả dương tính với phản ứng PCR được chọn để biểu hiện protein hIGF-1. Kết quả phân tích Tricine SDS-PAGE (hình 3A) cho thấy, các giếng 4 và 6 lần lượt là các mẫu protein tổng số và tủa của chủng *E. coli* Origami (DE3)/pET22b-IGF1 được cảm ứng biểu hiện có xuất hiện một vạch protein to và đậm nằm dưới vạch 14,4 kDa của thang chuẩn LMW, tương ứng với kích thước 7,5 kDa của protein hIGF-1. Mặt khác, ở giếng 2 là mẫu tế bào *E. coli* Origami (DE3) không mang

plasmid tái tổ hợp, không có vạch protein này. Như vậy, cả mẫu protein tổng số và tủa của chủng *E. coli* Origami (DE3)/pET22b-IGF1 được cảm ứng có vạch protein với kích thước tương ứng với protein hIGF-1 và phần lớn nằm trong pha tủa, nên có khả năng chủng *E. coli* Origami (DE3)/pET22b-IGF1 đã tổng hợp được protein hIGF-1 ở dạng thể vùi. Để chứng minh protein biểu hiện vượt mức trong tế bào chất *E. coli* là hIGF-1, chúng tôi tiến hành lai western với kháng thể đặc hiệu kháng hIGF-1.

Hình 3. Kiểm tra và xác nhận sự biểu hiện của hIGF-1 trong tế bào *E. coli* Origami (DE3)/pET22b-IGF1 bằng Tricine SDS-PAGE (A) và lai western (B).

1. Thang phân tử lượng thấp (LWM); 2. *E. coli* Origami (DE3); 3. *E. coli* Origami (DE3)/pET22b-IGF1 (-IPTG); 4. *E. coli* Origami (DE3)/pET22b-IGF1 (+IPTG) pha tổng; 5. *E. coli* Origami (DE3)/pET22b-IGF1 (+IPTG) pha nổi; 6. *E. coli* Origami (DE3)/pET22b-IGF1 (+IPTG) pha tủa.

Kết quả lai western (hình 3B) cho thấy có xuất hiện vạch lai khoảng 7,5 kDa ở pha tổng và pha tủa tương ứng với vạch protein biểu hiện vượt mức trên bản điện di Tricine SDS-PAGE (giếng 4, 6). Riêng giếng số 3 cũng xuất hiện vạch lai nhạt hơn, điều đó chứng tỏ chủng *E. coli* Origami (DE3)/pET22b-IGF1 không được cảm ứng IPTG vẫn biểu hiện được protein hIGF-1, điều này cho thấy, promoter T7 không được kiểm soát chặt chẽ. Như vậy, chúng tôi khẳng định protein biểu hiện vượt mức dưới sự cảm ứng bởi IPTG trên bản gel Tricine SDS-PAGE chính là protein hIGF-1.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tạo dòng thành công dòng tế bào *E. coli* Origami (DE3) có mang vector tái tổ hợp pET22b-IGF1. Dòng tế bào này có khả năng

biểu hiện vượt mức protein hIGF-1 ở dạng thể vùi trong tế bào chất. Sự tổng hợp protein đích trong dòng *E. coli* tái tổ hợp đã được kiểm chứng bằng phương pháp Tricine SDS-PAGE và khẳng định lại bằng phương pháp lai western. Đây là cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo bao gồm lên men thu nhận lượng lớn hIGF-1, tái gấp cuộn thu nhận hIGF-1 có hoạt tính sinh học, tinh chế thu nhận và kiểm tra hoạt tính sinh học protein hIGF-1 sau khi tái gấp cuộn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bonefeld K., Moller S., 2011. Insulin-like growth factor-1 and the liver. Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver, 31: 911-919.
2. Conti E., Musumeci M. B., Assenza E.,

- Quarta G., Autore C., Volpe M., 2008. Recombinant human insulin-like growth factor-1: A new cardiovascular disease treatment option?. *Cardiovascular and Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 6(4): 258-271.
3. Denley A., Cosgrove L. J., Booker G. W., Wallace J. C., Forbes B. E., 2005. Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16.
4. Froesch E. R., Hussain M., 1993. Therapeutic potential of rhIGF-I in diabetes and conditions of insulin resistance. *Journal of Internal Medicine*, 234(6): 561-70.
5. Hoppener J. W., de P. H. P., Geurts K. A. H., Jansen M., Kittur S. D., Antonarakis S. E., Lips C. J., Sussenbach J. S., 1985. The human gene encoding insulin-like growth factor I is located on chromosome 12. *Human Genetics*, 69(2): 157-60.
6. Jansen M., Van S. F. M., Ricker A. T., Bullock B., Woods D. E., Gabbay K. H., Nussbaum A. L., Van B. J. L., 1983. Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. *Nature*, 306(5943): 8-14.
7. Kim R. J., Grimberg A., 2007. Potential non-growth uses of rhIGF-1. *Growth Genet Horm*, 23: 1-7.
8. Levitsky L. L., 2012. Recombinant Human IGF-1 (Insulin-Like Growth Factor 1) Therapy: Where Do We Stand Today?. *The Indian Journal of Pediatrics*, 79(2): 244-249.
9. Rogol A. D., 2010. Drugs of abuse and the adolescent athlete. *Italian Journal of Pediatrics*, 36.
10. Sambrook J., Russell D. W., 2001. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd ed.
11. Schägger H., von J. G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2): 368-79.

CLONING AND EXPRESSION OF RHIGF-1 (HUMAN INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 1) IN *E. coli*

Duong Long Duy, Dang Thi Phuong Thao, Tran Linh Thuoc

University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh city

SUMMARY

The hIGF-1 (human Insulin-like Growth Factor 1) is a growth factor produced primarily by the liver under the stimulation of growth hormone (GH). rhIGF-1 is indicated for treatment of primary insulin-like growth factor-1 deficiency (IGFD) and is used for increasing muscle mass by athletes. Many researches have proved that hIGF-1 enhanced glycemic control in Type 1 Diabetes and Type 2 Diabetes. In addition, hIGF-1 has also shown the positive effects in patients with neural disease and cardiovascular disease. Many potential clinical applications of hIGF-1 are still being studied. In order to obtain a large amount of rhIGF-1 for research and treatment, we conduct the research on production of rhIGF-1. In this study, we report results of cloning and expressing rhIGF-1 in *E. coli*. The *higf-1* gene encodes for hIGF-1 was inserted into plasmid pET-22b under the control of T7 promoter to form recombinant plasmid pET22b-IGF1. This expression vector was checked by PCR, restriction enzyme and DNA sequencing. pET22b-IGF1 was transformed into *E. coli* Origami. The expression of rhIGF-1 was induced by IPTG and confirmed by SDS-PAGE and Western blot using monoclonal anti-hIGF-1 antibody. Overall, we succeeded in expressing rhIGF-1 in *E. coli* which will be used in the next researches.

Keywords: *E. coli*, recombinant protein, rhIGF-1, SDS-PAGE, western blot.

Ngày nhận bài: 21-6-2012