

TÁCH DÒNG VÀ BIỂU HIỆN YẾU TỐ SINH TRƯỞNG NGUYÊN BÀO SỢI 10 CỦA NGƯỜI (HFGF-10) Ở *E. COLI*

NGUYỄN BÍCH NHI

Viện Công nghệ sinh học

MASASHI SUZUKI

Viện Công nghệ sinh học và Nhân chủng học quốc gia Nhật Bản

Nhóm gen và protein của các yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi-Fibroblast Growth Factor (FGF) đóng vai trò quan trọng trong các quá trình sinh trưởng, biệt hóa tế bào, phát triển... Chúng có tác dụng như những mitogen tham gia vào các quá trình tạo mạch máu, làm lành vết thương, sửa chữa các mô... Các polypeptit này có 30-60% thành phần axit amin, các exon và các intron có cấu trúc tương tự nhau trong vùng gen mã hóa protein và có hoạt lực với glycosaminoglycan heparin [1,2,3].

FGF-10 là thành viên thứ 10 của gia đình FGF lần đầu tiên được tách chiết từ phôi chuột cống bằng phương pháp homology-PCR bởi Yamasaki và cs. 1996 [4]. cADN của FGF-10 chuột cống mã hóa cho 215 axit amin (khoảng 24 kDa) với đầu N kỵ nước, hoạt động như một signal peptit. mRNA của FGF-10 được biểu hiện nhiều ở phổi.

hFGF-10 người cADN lần đầu tiên được phân tách từ phổi bằng phương pháp RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) năm 1997 bởi Emoto và cs. [5]. cADN của hFGF-10 mã hóa cho một protein gồm 208 axit amin có trình tự có tính tương đồng cao với FGF-10 chuột cống (95,6%). hFGF-10 cũng như FGF-10 chuột cống có đoạn tín hiệu trình tự đầu N (khoảng 40 axit amin đầu).

Chúng tôi đã tách dòng, biểu hiện và tinh chế protein tái tổ hợp hFGF-10 ở *E.coli* để nghiên cứu các đặc tính của hFGF-10 tái tổ hợp trên các dòng tế bào.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Tách dòng cADN của hFGF-10

ARN tổng số của não người (Toyobo) được sử dụng làm mẫu cho phản ứng RT-PCR.

Phản ứng phiên mã ngược RT (reverse transcription) được tiến hành như sau: hỗn hợp phản ứng bao gồm đệm RT, mỗi ngẫu nhiên, DTT (dithio threitol), dNTP, chất ức chế ARN aza, MMLV (Moloney Murin leukemia virus) transcriptaza và ARN não được ủ ở 37°C trong 75 phút, sau đó pha loãng bằng nước cất. Sản phẩm thu được của phản ứng RT (cADN) được sử dụng làm mẫu để chạy phản ứng PCR tiếp theo.

Hỗn hợp phản ứng PCR bao gồm đệm PCR, dNTPs, sản phẩm RT, mỗi xuôi, mỗi ngược và enzym PFU polymeraza.

Chương trình chạy PCR: 94°C trong 2 phút, 35 chu trình : 94°C trong 45 giây, 55°C trong 45 giây, 72°C trong 2 phút và lần kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 10 phút.

Cặp môi được thiết kế để cầu toàn bộ gen hFGF-10 cADN với các vị trí của các enzym hạn chế *Sal I* và *Bam HI* định vị ở đầu 5' của chúng.

Môi xuôi: 5'- CCC GTC GAC CAT TGG AAA TGG ATA CTG ACA C- 3'

Môi ngược: 5'- CGC GGA TCC ACT ATG AGT GTA CCA CCA TTG G-3'

Sản phẩm của phản ứng RT-PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 1%. Đoạn ADN thu được được cắt ra khỏi gel agarosa, tinh chế bằng kit Qia Quick (Qia Gen), sau đó được gắn vào vectơ tạo dòng pCR Script (Stragene) để kiểm tra trình tự của đoạn cADN và được đối

chiếu với trình tự của hFGF-10 của Ngân hàng gen DDBJ. Trình tự của đoạn gen được xác định bởi máy ABI PRISM 310 (Perkin Elmer).

2. Biểu hiện của protein tái tổ hợp hFGF-10 ở *E. coli*

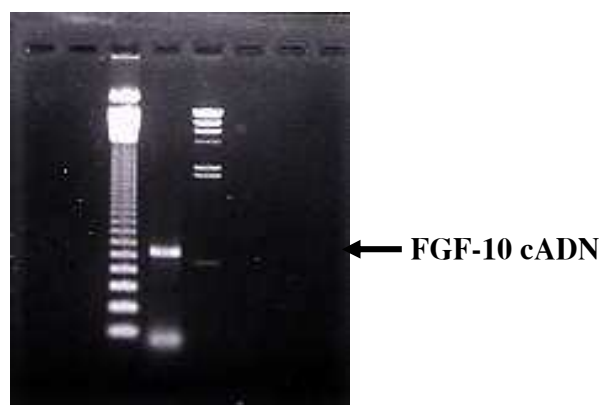
Để biểu hiện hFGF-10 protein ở *E. coli*, đoạn cADN mã hóa cho protein hFGF-10 đã loại đoạn trình tự tín hiệu (axit amin từ 40-208) được nhân lên khi sử dụng hFGF-10 cADN làm mẫu và môi xuôi 5'-ATC ATA TGG CCC TTG GTC AGG CAC TG 3' với vị trí của enzym hạn chế *NdeI* tại đầu 5' và vẫn sử dụng môi ngược trên. Phản ứng PCR được tiến hành trong các điều kiện tương tự đã mô tả ở trên. Sản phẩm của phản ứng PCR, sau khi được tinh chế bằng QiaQuick kit, được gắn vào vectơ tách dòng PCR TRAP (GenHunter Corporation) để kiểm tra trình tự của đoạn cADN. Tiếp theo, đoạn cADN này được thủy phân bởi các enzym hạn chế *NdeI* và *BamHI* và được gắn vào các vị trí *NdeI/BamHI* đã được cắt tương ứng của vectơ biểu hiện pET-3C với T7 promoter để biểu hiện protein tái tổ hợp hFGF-10. Plasmid ADN chứa đoạn hFGF-10 được biến nạp vào tế bào BL21(DE3)pLysS (*E. coli*). Tế bào *E. coli* có chứa plasmid tái tổ hợp được nuôi qua đêm ở

37°C trong môi trường lỏng Luria - Bertani (LB) chứa 50ug/ml ampicillin và chloramphenicol. Dịch nuôi cấy được pha loãng 100 lần bởi môi trường LB bổ sung ampicillin và chloramphenicol được ủ lắc ở 37°C đến OD 600nm của dịch nuôi cấy đạt 0.3. Thêm IPTG (isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside) vào dịch nuôi cấy tới nồng độ cuối cùng 1mM và nuôi tiếp 3 giờ ở 37°C. Các tế bào được thu hoạch bởi ly tâm, cặn tế bào được hòa vào đệm GET (glucoza 1%, EDTA 10mM, Tris-HCl 25mM) chứa chất ức chế sự hoạt động của proteinaza, tiếp theo các tế bào được phá vỡ bởi chu trình làm đông lạnh ở -70°C, sau đó làm tan ở nhiệt độ phòng 3 lần liên tiếp, được nghiền bởi máy siêu âm và ly tâm 15000 rpm/20 phút ở 4°C. Dịch nổi được bảo quản ở -80°C đến lúc sử dụng.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tách dòng hFGF-10 cADN từ ARN tổng số của não người

cADN của hFGF-10 được phân tách và nhận lên bởi phản ứng RT-PCR từ ARN tổng số của não người là một đoạn gen có kích thước khoảng 630 bp (hình 1).



Hình 1. Điện di sản phẩm của phản ứng RT-PCR trên gelagarosa 1% và nhuộm bằng ethidium bromit.

Ghi chú: Giếng 1: Marker ADN bậc thang 123 bp, giếng 2: hFGF-10 cADN, giếng 3: Marker λ /HindIII.

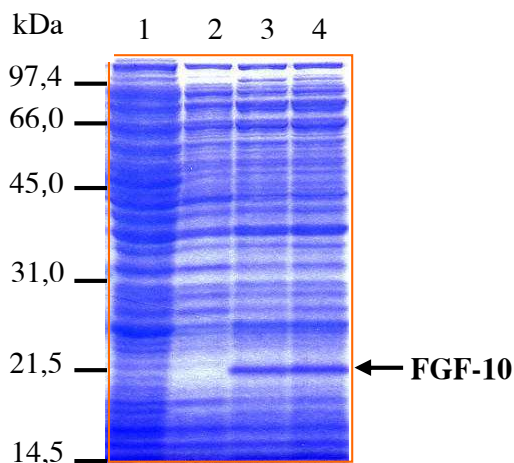
Đoạn cADN này được tinh chế và gắn vào PCR Blue Script cloning vectơ để kiểm tra trình tự. Kết quả cho thấy đoạn cADN đó chính là gen hFGF-10 khi đối chiếu với số liệu của Ngân hàng gen quốc tế có số đăng ký AB 002097 DDBJ (hình 2).

atgtggaaatggatactgacacattgtgcctcagccttccccacctgccccggtgctgctgct
 gctgctttttgttgctgttcttgggtgtcttccgctccctgacacctgccaagcccttggtcaggaca
 tgggtgcaccagagggccaccaactcttcttcttctcttctctctctctctctctctctccagcggggaag
 gcatgtgctgagctcaatcaccttcaaggagatgtccgctggagaagctatttctctttcac
 caagtacttttcaagattgagaagaacggggaaggctcagcgggaccaagaaggagaactgc
 ccgtacagcatcctggagataacatcagtagaatcggagttgttccgctcaagccattaac
 agcaactattacttagccatgaacaagaaggggaaactctatggctcaaaagaatttaacaat
 gactgtaagctgaaggagagatagaggaaaatggatacaatacctatgcatcatttaactgg
 cagcataatgggaggcaaagtatgtggcattgaatggaaaaggagctccaaggagaggaca
 gaaaacacgaaggaaaaacacctctgctcactttctccaatggtggtacactcatag

Hình 2. Trình tự gen của h-FGF-10

2. Biểu hiện của protein tái tổ hợp hFGF-10 ở *E. coli*

Để biểu hiện protein tái tổ hợp hFGF-10, vector biểu hiện pET-3C đã được thiết kế để gắn đoạn gen hFGF-10 với vị trí cắt của enzym hạn chế *NdeI/BamHI*. Cặp mỗi FGF-10, trừ đoạn tín hiệu peptit, được thiết kế để cấu trúc đoạn gen hFGF-10 đã loại đoạn tín hiệu peptit (khoảng 120 nucleotit đầu tiên mã hóa cho 40 axit amin đầu N của protein tái tổ hợp hFGF-10) cũng gắn vị trí cắt của các enzym *NdeI/BamHI* tương ứng. Đoạn cADN của hFGF-10 đã loại đoạn tín hiệu peptit (được gắn vào vector tách dòng PCR - TRAP để kiểm tra trình tự gen, sau đó được thủy phân bằng *NdeI* và *BamHI* rồi được gắn vào đúng vị trí tương ứng *NdeI/BamHI* của vector biểu hiện pET-3C và biến nạp vào tế bào khả biến GH (GenHunter). Các khuẩn lạc được kiểm tra đoạn gen được chèn vào bởi phân tích khuẩn lạc sử dụng phản ứng PCR. Các khuẩn lạc có chứa đoạn gen hFGF-10 được nuôi trong môi trường LB qua đêm, thu tế bào để tách ADN plasmid. ADN của plasmid có chứa đoạn gen chèn được biến nạp vào tế bào BL21(DE3)pLysS. Các tế bào này được nuôi như đã mô tả trong phương pháp nghiên cứu. Sự biểu hiện của protein tái tổ hợp được tiến hành khi dịch nuôi cấy đạt OD 600nm xấp xỉ 0.3 trong điều kiện nuôi cấy lắc ở 37°C, thêm IPTG (nồng độ cuối cùng 1 mM) vào dịch nuôi cấy và tiếp tục nuôi tiếp 3 giờ ở hai nhiệt độ 37°C và 30°C. Sau đó, các tế bào được thu hoạch bằng ly tâm, phân giải trong đệm GET và kiểm tra sự biểu hiện của protein tái tổ hợp bằng điện di SDS-PAGE (hình 3).



Hình 3. Sự biểu hiện của protein tái tổ hợp hFGF-10 ở *E. coli* trên gel polyacrylamit 12%.

Ghi chú:

Giếng 1: dịch chiết tế bào không cảm ứng bởi IPTG; giếng 2: dịch chiết tế bào trước khi cảm ứng bởi IPTG; giếng 3: dịch chiết tế bào sau khi cảm ứng bằng IPTG trong 3 giờ nuôi ở 37°C; giếng 4: dịch chiết tế bào sau khi cảm ứng bằng IPTG trong 3 giờ nuôi ở 30°C.

Qua hình 3, chúng tôi quan sát thấy ở giếng 3 và 4, phổ protein của các dịch chiết tế bào đều xuất hiện một băng đậm có kích thước khoảng 20 kDa và không có băng này ở dịch chiết tế bào nuôi cấy đối chứng không có sự cảm ứng bằng IPTG (giếng 1) cũng như trước khi cảm ứng bằng IPTG (giếng 2). Như vậy có một protein tái tổ hợp kích thước khoảng 20 kDa đã được sinh ra sau khi cảm ứng với IPTG. Sự biểu hiện của protein này ở điều kiện nhiệt độ 30°C và 37°C là tương tự như nhau.

III. KẾT LUẬN

Qua những kết quả đã trình bày trên, chúng tôi xin tóm tắt lại như sau:

1. Đã tách được gen hFGF-10 từ cADN được tổng hợp từ ARN của não người dài 624 bp, có trình tự khớp với trình tự đã đăng ký ở ngân hàng gen AB 002097 DDBJ.

2. Đã thiết kế vectơ biểu hiện pET-3C để gắn gen hFGF-10 và biểu hiện thành công protein tái tổ hợp hFGF-10 ở *E.coli*. Protein tái tổ hợp hFGF-10 có kích thước khoảng 20 kDa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Beer H. D. et al.**, 1997: *Oncogene*, 15 (18): 2211-2218.
2. **Asada M. et al.**, 1999: *Growth Factors*, 16: 293-303.
3. **Yoneda A. et al.**, 1999: *Biotechniques*, 27:576-590.
4. **Yamasaki M. et al.**, 1996: *J. Biol. Chem.*, 271: 15918-15921.
5. **Emoto H. et al.**, 1997: *J. Biol.Chem.*, 272 (37): 15918-15921.

CLONING AND EXPRESSION OF THE HUMAN FIBROBLAST GROWTH FACTOR 10 (hFGF-10) IN *E. COLI*

NGUYEN BICH NHI, MASASHI SUZUKI

SUMMARY

Full length hFGF-10 cDNA (624 bp - 208 amino acids) was amplified from the human brain total RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and cloned into the pCR Script cloning vector for the verification of the DNA sequence as hFGF-10 (accession number AB 002097 in DDBJ and GenBank Nucleotide Sequence Databases). For the expression of hFGF-10 in *E.coli*, the cDNA encoding hFGF-10 (amino acids 40-208 eliminating the N-terminal sequence) was amplified and cloned into the pET-3C expression vector with cloning sites *NdeI/BamHI* and transfected into the BL21(DE3)pLysS cells. *E.coli* cells bearing the recombinant plasmid were grown in LB medium containing ampicillin and chloramphenicol until OD 600 nm reached 0.3 and the expression of the hFGF-10 was induced by adding IPTG and followed by incubation at 37°C or 30°C for 3h. Cells were centrifuged, resuspended in GET buffer and lysed by sonication. The supernatants were cleared by the centrifugation and analysed by SDS-PAGE. The results showed that the hFGF-10 recombinant protein was produced and its size was about 20kDa.

Ngày nhận bài: 12-3-2002