

## CHUYỂN VÀ BIỂU HIỆN GIEN YẾU TỔ SINH TRƯỞNG NGUYÊN BÀO SỢI 10 NGƯỜI (*hFGF-10*) Ở TẾ BÀO ĐỘNG VẬT BẬC CAO

NGUYỄN BÍCH NHI

*Viện Công nghệ sinh học*

MASASHI SUZUKI

*Viện nghiên cứu quốc gia về Sinh học và Công nghệ người, Nhật Bản*

Các yếu tố sinh trưởng của nguyên bào sợi - Fibroblast growth factors (FGFs) là những polypeptit có hoạt tính gây phân bào mạnh, được đặc trưng bởi ái lực cao đối với heparin. Các thành viên của nhóm FGF đóng vai trò quan trọng trong nhiều quá trình sinh lý như quá trình sinh trưởng của tế bào, quá trình biệt hóa tế bào, sự hình thành các mô, mạch máu, quá trình sửa chữa và làm lành vết thương, ... [7].

Gien *hFGF-10* là thành viên thứ 10, được tách ra lần đầu tiên bởi Emoto và cs. [4] từ phổi. cADN của gen *hFGF-10* mã hóa cho một protein hFGF-10 có chứa 208 axit amin, có sự tương đồng cao với FGF-10 của chuột cống (95.6%). Cũng như FGF-10 của chuột cống, FGF-10 của người có đầu N tận cùng có tính kỵ nước cao (khoảng 40 axit amin) có thể hoạt động như một tín hiệu trình tự [4, 10]. Nhiều thành viên của nhóm gen FGF có chứa tín hiệu trình tự mã hóa cho các protein tiết. Một số thành viên của nhóm FGF như FGF-5 [2, 3], FGF-7 [5], FGF-9 [6], FGF-9 [9] ... có chứa vị trí N-glycosyl, do đó một số thành viên của FGF đã được tinh chế ở dạng glycosyl. Tuy nhiên, hiện tượng glycosyl hóa vẫn còn chưa được nghiên cứu. Để tìm hiểu chức năng của FGF-10 trong sự biến đổi các mạch cacbohydrat, chúng tôi đã thiết kế một hệ thống biểu hiện của FGF-10 ở tế bào động vật sử dụng vectơ biểu hiện pcADN 3.1(-)Myc-His.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Thiết kế vectơ biểu hiện pcADN3.1(-)Myc-His (Version B)

Đoạn FGF-10 người cADN đã được tách và

nhân lên từ ARN tổng số của não người (Toyobo) bằng phản ứng RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) sử dụng các oligonucleotit tổng hợp. Vectơ pcADN3.1(-)Myc-His Version B (Invitrogen) được thiết kế để sản sinh ra protein tái tổ hợp ở các tế bào động vật đã được sử dụng để gắn đoạn *hFGF-10* cADN vào các vị trí cắt của các enzym hạn chế *XhoI/HindIII* với đầu C tận cùng chứa đuôi polyhistidin gắn kim loại (His tag) và đoạn *myc (c-myc)* epitop.

ADN của plasmit chứa toàn bộ gen *hFGF-10* đã được sử dụng làm mẫu cho phản ứng PCR với các cặp mồi 5'-CCC CTC GAG ATG AAA TGG ATA CTG ACA C-3' và 5'-CCC AAG CTT GAG TGA CCA CCA TTG GAA G-3' với các vị trí cắt của enzym hạn chế *XhoI* và *HindIII* định vị ở các đầu 5'. Sản phẩm của phản ứng PCR được cắt ra từ agarosa gel, sau đó sử dụng QiaQuick PCR kit (QiaGen) để tinh sạch rồi gắn vào vectơ pCR Script (Stratagene) để kiểm tra trình tự của đoạn cADN. Tiếp theo, vectơ pCR Script có chứa đoạn *hFGF-10* cADN được thủy phân bởi các enzym hạn chế *XhoI* và *HindIII* (TaKaRa, Nhật Bản) và được gắn vào các vị trí tương ứng *XhoI/HindIII* của vectơ bằng phản ứng gắn kết (ligation reaction). Hỗn hợp phản ứng gắn này được biến nạp vào *E.coli*. Các khuẩn lạc chứa đoạn *hFGF-10* cADN được tuyển chọn và kiểm tra trình tự bởi máy xác định trình tự ABI PRISM (Perkin Elmer) để khẳng định rằng gen *hFGF-10* (theo trình tự đã đăng ký ở Ngân hàng dữ liệu gen số AB002097) đã được gắn vào đúng vị trí với đầu C tận cùng peptit.

## 2. Nuôi tế bào:

Tế bào COS-1 và COS-7 được mua từ Ngân hàng gien Riken (Tsukuba, Ibaraki, Japan). Các tế bào được nuôi ổn định trong môi trường DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) chứa 10% FBS (Fetal Bovine Serum) ở 37°C và 5% CO<sub>2</sub>.

## 3. Chuyển gien

Tế bào COS-1 và COS-7 đã được chuyển gien *hFGF-10* cADNsử dụng Lipofectamin 2000 (LF 2000) (Gibco BP) và SuperFect (SF) (Qiagen).

### a) Sự chuyển gien *hFGF-10* vào tế bào COS-1 và COS-7 sử dụng LF2000

Vào hôm trước ngày chuyển gien, các tế bào được thủy phân bằng trypsinaza, đếm và cấy vào đĩa có đường kính 60 mm, mỗi đĩa có  $9 \times 10^5$  tế bào để sao cho chúng sẽ phủ 90-95% mặt đáy của đĩa vào ngày chuyển gien. Các tế bào được nuôi bình thường trong môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS. Cho 9 ug ADN plasmit có chứa gien *hFGF-10* vào 500 ul DMEM không bổ sung FBS và 33.6 ul LF 2000 đã được pha loãng trong 500 ul DMEM và ủ trong vòng 5 phút ở nhiệt độ phòng. ADN đã được pha loãng phối hợp với LF 2000 đã pha loãng và hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút để tạo phức liên kết giữa ADN - LF 2000. Hút loại môi trường nuôi cấy cũ từ các đĩa, cho 5 ml DMEM mới và 1ml ADN-sLF 2000 vào mỗi đĩa, nuôi tiếp trong tủ nuôi cấy CO<sub>2</sub> ở 37°C trong 4-5 giờ. DMEM chứa 20% FBS được cho vào sao cho nồng độ cuối cùng trong mỗi đĩa là 10% FBS. Các tế bào được thu hoạch sau 24 và 48 giờ.

### b) Sự chuyển gien *hFGF-10* vào tế bào COS-1 và COS-7 sử dụng SF

Trước ngày chuyển gien, các tế bào được thủy phân bằng trypsinaza, đếm và cấy vào các đĩa có đường kính 60 mm, mỗi đĩa có  $8 \times 10^5$  tế bào sao cho chúng sẽ phủ 80% mặt đáy của đĩa vào ngày chuyển gien trong môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS. Đối với mỗi đĩa, 5 ug ADN được pha vào 150 ul DMEM. 30 ul SF được cho vào dung dịch ADN và hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, sau đó thêm 1ml DMEM chứa 10% FBS. Môi trường nuôi cấy cũ được hút loại bỏ từ mỗi đĩa, các tế bào được rửa bằng đệm PBS, sau đó cho hỗn hợp

ADN-SF vào mỗi đĩa. Các tế bào được ủ trong tủ nuôi cấy 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong 2-3 giờ. Sau đó loại bỏ môi trường chứa phần còn lại của phức hợp ADN-SF, các tế bào được rửa bằng đệm PBS và thêm 5ml môi trường DMEM mới với 10% FBS và ủ tiếp 24 hoặc 48 giờ đến khi thu hoạch.

### c) Phân tích sự biểu hiện của protein tái tổ hợp *hFGF-10* ở tế bào COS-1 và COS-7

Để xác định protein *hFGF-10* bên trong tế bào, các tế bào được rửa bằng đệm PBS lạnh (không chứa Ca, Mg) hai lần, sau đó được phân giải trong đệm RZPA (20 mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% deoxycholat, 0.1% SDS, 1 mM NaVO<sub>4</sub>) trong 30 phút ở 4°C. Dịch phân giải tế bào được ly tâm 15000 rpm trong 20 phút ở 4°C, dịch nổi là dịch chiết tế bào được bảo quản ở -20°C.

Để xác định protein *hFGF-10* được tiết từ tế bào vào môi trường nuôi cấy, môi trường nuôi cấy được ly tâm 3000 rpm trong 3 phút ở 4°C, dịch nổi được ly tâm tiếp 15000 rpm trong 10 phút ở 4°C. Lấy dịch trong ủ với nhựa Ni-NTA qua đêm ở 4°C, rồi nhồi nhựa vào cột, rửa bằng đệm phosphate 50mM, pH8.0, 300mM NaCl, 10 mM Imidazol. Dịch rửa được đo OD280nm đến khi đạt xấp xỉ bằng 0. Protein *hFGF-10* được thôi bằng đệm photphat 50 mM, pH = 8.0, 2 M NaCl, 2 M Imidazol. Dịch thôi protein được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

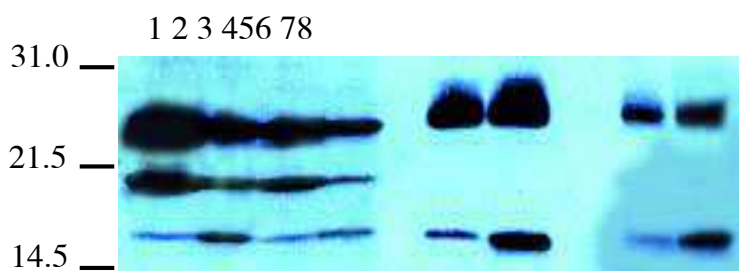
Các mẫu dịch chiết tế bào và dịch chiết từ môi trường nuôi cấy được biến tính trong 2-mercaptoethanol và được chạy SDS-PAGE 12% gel. Các protein tách ra được chuyển sang màng nitroxelluloza (Schleicher & Schuell, Germany), sau đó được ủ với 5% skim milk, rồi nhuộm với monoclonal antihistidin antibody và được xác định với HRP- conjugated secondary antibody againts mouse IgG và được hiển thị với ECL kit (Amersham).

## 4. Thủy phân liên kết N-glycosidaza

N-glycosidaza F (PNGaza, peptit-N4 axetyl- $\beta$ -glucosaminy) asparagin amidaza (Boehringer Mannheim) đã được sử dụng để thủy phân protein glycosylated *hFGF-10* trong các mẫu dịch phân giải tế bào và trong môi trường nuôi cấy. Các mẫu sau khi được thêm SDS đến nồng

độ cuối cùng 0.1%, được đun ở 95°C trong 5 phút, làm lạnh, thêm NP-40 sao cho nồng độ đạt 1% và thêm N-glycosidaza (2 Units/10ug glycoprotein). Các hỗn hợp được ủ ở 37°C qua đêm, sau đó dịch thủy phân enzym được chạy SDS-PAGE và phân tích Western - Blotting như đã được mô tả ở trên.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN



Hình 1. Biểu hiện của hFGF-10 myc-his ở dịch tế bào COS-1, COS-7 và sự tách chiết nó từ môi trường nuôi cấy.

**Ghi chú:** Các protein đã được phân tách bằng SDS-PAGE, sau đó được chuyển sang màng nitroxelluloza và được ủ với kháng thể đơn dòng kháng histidin. Markơ có trong lượng phân tử thấp (kDa).

Giếng 1, 2: dịch tế bào COS-1 sau 1 ngày, 2 ngày chuyển gen

Giếng 3, 4: dịch tế bào COS-7 sau 1, 2 ngày chuyển gen

Giếng 5, 6: môi trường nuôi cấy tế bào COS-1 được thu hoạch 1 ngày, 2 ngày sau khi chuyển gen

Giếng 7, 8: môi trường nuôi cấy tế bào COS-7 sau 1, 2 ngày chuyển gen

Từ các kết quả nhận được ở hình 1, chúng tôi thấy trong cả hai loại mẫu phân tích là mẫu dịch tế bào (giếng 1, 2, 3, 4) và mẫu môi trường nuôi cấy đã được xử lý (giếng 5, 6, 7, 8) đều phát hiện các băng bắt màu với kháng thể kháng histidin tương ứng với một số dạng được tiết ra của FGF-10. Điều đó chứng tỏ rằng gen tái tổ hợp *hFGF-10* đã được chuyển sang tế bào COS-1, COS-7 và được biểu hiện dưới dạng protein có khả năng tiết đã được tổng hợp trong tế bào và tiết vào môi trường nuôi cấy. Các kết quả còn cho thấy sự biểu hiện của gen *hFGF-10* ở tế bào COS-1 mạnh hơn ở tế bào COS-7 trong các điều kiện tương ứng.

Trong dịch tế bào ở cả hai loại COS-1 và COS-7, chúng tôi quan sát thấy có ba băng, trong số đó có hai băng đậm hơn. Băng ở vị trí trên tương ứng với một protein có kích thước khoảng 32-33 kDa, có thể là dạng glycosylated của hFGF-10 myc-his. Băng ở giữa có thể nhận là hFGF-10 myc-his tái tổ hợp ( dạng thường

### 1. Biểu hiện của hFGF-10 myc-his ở tế bào COS-1 và COS-7 sử dụng LF-2000

Các tế bào đã được chuyển gen và môi trường nuôi cấy được thu hoạch sau 24 giờ (1 ngày) và 48 giờ (2 ngày). Dịch tế bào và môi trường nuôi cấy được xử lý bằng nhựa Ni-NTA được phân tích bằng phương pháp Western-Blotting sử dụng kháng thể kháng histidin. Kết quả được biểu thị trên hình 1.

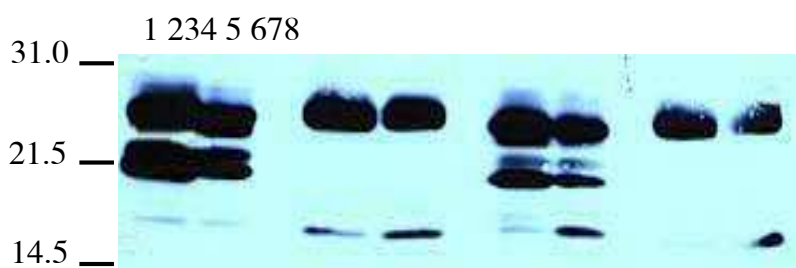
gặp) với trọng lượng phân tử khoảng 27 kDa (trọng lượng phân tử của toàn bộ gen *hFGF-10* xấp xỉ 24 kDa, thêm đuôi myc-his xấp xỉ 3 kDa, tổng cộng là khoảng 27 kDa). Băng ở dưới có thể là hFGF-10 myc-his không có đoạn tín hiệu trình tự tương ứng với trọng lượng phân tử khoảng 22-23 kDa (đoạn gen *hFGF-10* loại bỏ tín hiệu trình tự mã hóa cho một polypeptit có trọng lượng xấp xỉ 19-20 kDa, cộng thêm đoạn đuôi myc-his 3 kDa từ vectơ pcADN). Chúng tôi cũng còn kiểm tra sự biểu hiện của *hFGF-10* sử dụng hai môi trường nuôi cấy có điều kiện DMEM có bổ sung 0.1% và 10% FBS. Các kết quả nhận được cho thấy sự biểu hiện của *hFGF-10* được nuôi cấy trong môi trường DMEM có bổ sung 0.1% FBS thấp hơn trong môi trường có bổ sung 10% FBS (các kết quả không trình bày). Sự biểu hiện của FGF-10 trong dịch tế bào sau một ngày chuyển gen cao hơn sau hai ngày chuyển gen. Ngược lại, trong môi trường nuôi cấy đã được xử lý bằng nhựa Ni-NTA, nồng độ

của FGF-10 tại một ngày sau khi chuyển gen thấp hơn hai ngày sau khi chuyển gen. Tỷ số giữa nồng độ FGF-10 trong dịch tế bào và trong môi trường nuôi cấy tại thời điểm một ngày sau chuyển gen được ước lượng xấp xỉ 3:1, tại thời điểm hai ngày sau khi chuyển gen tương ứng khoảng 1:1. Các kết quả này chỉ ra rằng FGF-10 đã được tiết ra từ tế bào vào môi trường trong thời gian nuôi cấy. Trong môi trường nuôi cấy, sự biểu hiện của *hFGF-10* chỉ có hai băng phía trên tương ứng với băng có kích thước 32 kDa và 22 kDa ở trong dịch tế bào. Các kết quả này

chỉ ra rằng sự biểu hiện của FGF-10 ở tế bào COS-1 và COS-7 FGF-10 tiết ra ở một số dạng khác nhau.

## 2. Biểu hiện của *hFGF-10 myc-his* ở tế bào COS-1 và COS-7 sử dụng Super Fect (SF)

Kết quả tương tự nhận được khi sử dụng tác nhân chuyển gen SF để chuyển gen *hFGF-10* vào tế bào COS-1 và COS-7 (hình 2). Từ kết quả đó chúng ta có thể sử dụng cả hai loại tác nhân LF 2000 và SF để chuyển FGF-10 vào tế bào COS-1 và COS-7.



Hình 2. Sự biểu hiện của *hFGF-10 myc-his* ở tế bào COS-1 và COS-7 sử dụng Super Fect bởi phản ứng hóa miễn dịch với antihistidin monoclonal antibody.

**Ghi chú:** Marker protein có trọng lượng phân tử thấp (kDa).

Giếng 1, 2: dịch tế bào COS-1 tại 1 ngày, 2 ngày sau khi chuyển gen.

Giếng 3, 4: dịch tế bào COS-7 tại 1 ngày, 2 ngày sau khi chuyển gen.

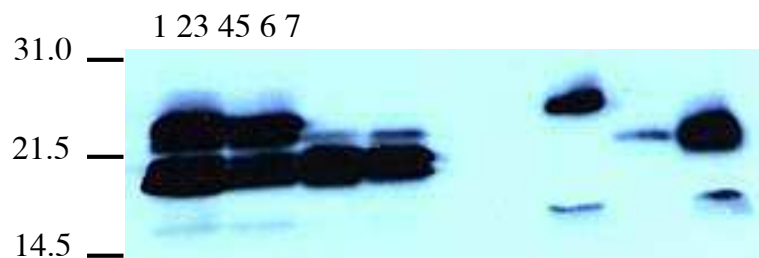
Giếng 5, 6: môi trường nuôi cấy tế bào COS-1 tại thời điểm 1 ngày, 2 ngày sau khi chuyển gen.

Giếng 7, 8: môi trường nuôi cấy của tế bào COS-7 tại thời điểm 1 ngày, 2 ngày sau khi chuyển gen.

## 3. Gen *hFGF-10* được biểu hiện một phần dưới dạng glycosyl

Để khẳng định băng trên cùng (32 kDa) là thuộc dạng glycosyl của gen *hFGF-10*, chúng tôi đã tiến hành thủy phân các glycoprotein

trong dịch tế bào và trong dịch môi trường nuôi cấy đã xử lý bằng nhựa Ni-NTA bởi enzym N-glycosidaza trong các điều kiện đã mô tả ở phần phương pháp nghiên cứu. Dịch thủy phân enzym được sử dụng để phân tích Western-Blotting. Kết quả nhận được ở hình 3.



Hình 3. Sự thủy phân bởi N-glycosidaza của dịch tế bào và môi trường nuôi cấy của tế bào COS-1 đã được chuyển gen *hFGF-10* sử dụng tác nhân LF 2000.

**Ghi chú:** Protein chuẩn có trọng lượng phân tử thấp (kDa).

Giếng 1, 2: các mẫu dịch tế bào được thu hoạch tại thời điểm 1 ngày, 2 ngày sau khi chuyển gen.

Giếng 3, 4: mẫu dịch tế bào được thu hoạch tại 1 ngày, 2 ngày sau khi thủy phân bởi N-glycosidaza.

Giếng 5: mẫu môi trường nuôi cấy trước khi thủy phân enzym.

Giếng 6, 7: mẫu môi trường nuôi cấy sau khi thủy phân bằng N-glycosidaza.

Qua hình 3 chúng tôi nhận thấy, ở cả dịch tế bào và môi trường nuôi cấy các mẫu sau khi được thủy phân bởi N-glycosidaza, băng trên cùng tương ứng với kích thước khoảng 32 kDa bị biến mất và băng thứ 2 tương ứng với kích thước 27 kDa được dày lên. Như vậy có thể khẳng định băng phía trên 32 kDa chính là dạng glycosyl của gen *hFGF-10* đã bị N-glycosidaza thủy phân để biến thành *hFGF-10*. Như vậy *hFGF-10* được biểu hiện ở tế bào động vật dưới dạng glycosyl và không glycosyl. Các kết quả nhận được từ các tác giả khác [4-11] cũng chứng minh rằng một số thành viên FGF cũng biểu hiện ở dạng glycosyl (FGF-6, FGF-16, ...).

### III. KẾT LUẬN

1. Sử dụng tác nhân chuyển gen Lipogectamin 2000 (LF 2000) và Super Fect (SF), đã chuyển được gen *hFGF-10* vào tế bào COS-1 và COS-7.

2. Sự biểu hiện của gen *hFGF-10* ở tế bào COS-1 và COS-7 sử dụng LF-2000 và SF trong dịch tế bào và môi trường nuôi cấy có sự giống nhau. Trong cả dịch tế bào và môi trường nuôi cấy *hFGF-10* tái tổ hợp được biểu hiện ở các dạng glycosyl và không glycosyl hóa. Trong dịch tế bào, còn có thêm dạng *hFGF-10* tái tổ hợp thiếu đoạn signal sequence.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Asada M. et al.**, 1999: Growth Factor, 16: 293-303.
2. **Bates B. et al.**, 1991: Mol.Cell Biol., 11: 1840-1845.
3. **Clements D. A. et al.**, 1993: Oncogene, 8: 1311-1316.
4. **Emoto H. et al.**, 1997: J. Biol. Chem., 272(37): 23191-23194.
5. **Hsu Y. R. et al.**, 1998: Protein Expr.Purf., 12: 189-200.
6. **MacArthur C. A. et al.**, 1995: Cell Growth Differ, 6: 817-825.
7. **McKeehan W. L., Wang F., Kan M.**, 1998: Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 59: 135-176.
8. **Revest J. M., DeMoerlooze L., Dickson C.**, 2000: J. Biol. Chem., 275: 8083-8090.
9. **Santos-Ocampo S. et al.**, 1996: J.Biol. Chem., 19: 1726-1731.
10. **Yamasaki M. et al.**, 1996: J. Biol. Chem., 271: 15918-15921.
11. **Yoneda A. et al.**, 1999: Biotechniques, 27: 576-590.

## TRANSFECTION AND EXPRESION OF THE HUMAN FIBROBLAST GROWTH FACTOR –10 (HFGF-10) IN MAMMALIAN CELLS

NGUYEN BICH NHI, MASASHI SUZUK

### SUMMARY

We have constructed a pcDNA 3.1.(-)Myc-His Version B vector for expression of the *hFGF-10* recombinant proteins in the COS-1 and COS-7 cells. LipoFectamin 2000 (LF-2000) and SuperFect (SF) were used for transient transfection. The expression of *hFGF-10* recombinant proteins in COS-1 and COS-7 cells was analysed by SDS-PAGE following Western-Blotting analysis using anti-histidine antibody. The results showed that *hFGF-10* proteins were secreted and expressed in several glycosylated and non-glycosylated forms in the cells and in the culture medium.

Ngày nhận bài: 12-3-2003