

## BIỂU HIỆN VÀ TINH CHẾ $\omega$ -CONOTOXIN MVIIA TÁI TỔ HỢP Ở *E. COLI*

BÙI THỊ HUYỀN, LÊ THỊ BÍCH THẢO,  
NGUYỄN BÍCH NHI, PHAN VĂN CHI

*Viện Công nghệ sinh học*

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Vật liệu

Các plasmid CTXpBT mang gen mã hóa  $\omega$ -conotoxin MVIIA là kết quả nghiên cứu của Phòng Hóa sinh protein. Vector biểu hiện pET32c(+), chủng vi khuẩn BL21(DE3) của Novagen. Các enzyme giới hạn *Bam*HI, *Nco*I, enterokinase do hãng Fermentas cung cấp. Sepharose chelating mua của Amersham Pharmacia Biotech và một số hóa chất khác.

#### 2. Phương pháp

##### a. Thiết kế vector biểu hiện gen mã hóa cho $\omega$ -CTX

Gen  $\omega$ -CTX sau khi đã được tách dòng sử dụng vector pBT (Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học) và xác định đúng trình tự thiết kế được chuyển vào vector pET32c (+) để biểu hiện. Vector tách dòng CTXpBT và vector pET32c (+) cùng đồng thời được xử lý với hai enzyme giới hạn là *Nco*I và *Eco*RI để tạo đầu dính tương hợp giữa đoạn gen cần chèn và vector. Sau khi được làm sạch từ gel agarose, gen  $\omega$ -CTX và vector pET32c được nối ghép với nhau nhờ enzyme T4 DNA ligase ở 22°C qua đêm. Sau đó, sản phẩm gắn kết được biến nạp vào chủng *E. coli* DH5 $\alpha$  để chọn dòng những vector pET32c(+) có chứa gen  $\omega$ -CTX. Vector tái tổ hợp này được ký hiệu là CTXpET32c sau đó được biến nạp vào chủng *E. coli* BL21(DE3) để biểu hiện. Tính toán lý thuyết cho thấy, protein tái tổ hợp (Trx-CTX) có kích thước khoảng 21 kDa.

##### b. Biểu hiện $\omega$ -CTX ở *E. coli*

Plasmid tái tổ hợp CTXpET32c mang gen mã hóa cho  $\omega$ -CTX được biến nạp vào *E. coli*

Ốc cối (*Conus*) là một trong những đối tượng đang được tập trung nghiên cứu do nọc của chúng có chứa các hợp chất (chủ yếu là neuropeptide và được gọi là conotoxin) có đích tác dụng trên các kênh vận chuyển ion qua màng tế bào [13, 8, 7]. Một số các peptide loại này đã được chứng minh có khả năng làm giảm đau hiệu quả trong rất nhiều trường hợp, ngay cả đối với chứng đau dai dẳng do ung thư và AIDS [12, 13, 10]. Một số conotoxin còn có tác dụng chống đột quy/nhồi máu cơ tim trên các mô hình động vật thực nghiệm [14, 6, 5]. Các nghiên cứu hiện nay đang tập trung nghiên cứu tác dụng dược lý của nọc độc bắt nguồn từ những phân tích về trình tự gen, cấu trúc bậc nhất và cấu trúc không gian của conotoxins. Từ khoảng 700 loài ốc cối đã được phát hiện [9], đã có 1214 trình tự nucleotide, 2258 trình tự protein và 99 cấu trúc 3D đã được công bố [11]. Dự án CONCO nghiên cứu về các sản phẩm của gen, tập trung phát hiện và phát triển dược phẩm sinh học trên cơ sở nguồn hợp chất có trong nọc độc của các loài ốc cối có khả năng chữa bệnh (<http://conco.eu/>). Dự án này hứa hẹn nhiều kết quả có ý nghĩa đối với sức khỏe con người trong chẩn đoán và điều trị bệnh.

Việc tách chiết trực tiếp các peptide có hoạt tính dược lý từ bầu độc của ốc cối thường có hiệu suất thấp, độ tinh sạch không cao do sự đa dạng về thành phần protein/peptide trong nọc và hàm lượng mỗi loại lại rất nhỏ. Do vậy, các peptide độc hầu hết được tạo ra ở dạng tái tổ hợp hoặc tổng hợp hóa học [1, 3, 4].

Bài báo này giới thiệu kết quả thiết kế biểu hiện và tinh chế protein  $\omega$ -CTX ở *E. coli* trên cơ sở trình tự gen mã hóa  $\omega$ -conotoxin MVIIA ( $\omega$ -CTX) đã được Bùi Thị Huyền và cs. công bố gần đây [2] từ Phòng Hóa sinh protein, viện Công nghệ sinh học.

BL21(DE3) và biểu hiện bằng cách cảm ứng với IPTG. Khi chủng vi khuẩn mang plasmid tái tổ hợp được nuôi trong môi trường LB ở nhiệt độ 37°C trong khoảng 2 giờ đạt giá trị OD<sub>600nm</sub> là 0,5-0,7 thì bổ sung IPTG với nồng độ cuối cùng là 1 mM. Tế bào tiếp tục được nuôi khoảng 3h thì thu sinh khối tế bào bằng cách ly tâm 5000 vòng/phút để loại môi trường. Protein từ sinh khối tế bào được chiết ra khỏi tế bào và kiểm tra bằng SDS-PAGE. Đánh giá sự biểu hiện của protein được tính theo thời gian, kích thước của protein được so sánh theo thang protein chuẩn.

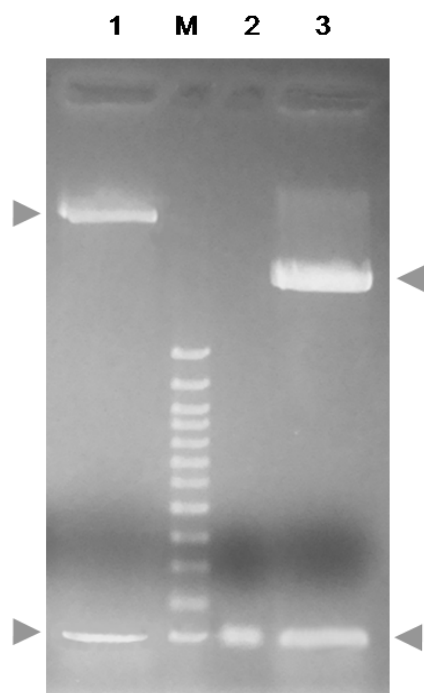
### c. Tinh chế protein Trx-CTX và ω-CTX

Gen mã hóa ω-CTX được thiết kế nối với 109 acid amin của thioredoxin giúp tăng khả năng hình thành cấu trúc không gian của protein đồng thời được nối với đoạn peptide gồm 6 histidine thuận lợi cho việc tinh sạch protein. Protein dung hợp được tinh sạch nhờ chất giá

Sephacrose Chelating. Hỗn hợp protein được đưa lên cột và rửa trôi các protein không bám cột bằng đệm Tris-Cl. Khi cột đã sạch các protein tạp thì protein dung hợp Trx-CTX được thôi ra trực tiếp bằng Imidazole nồng độ 500 mM. Chọn lọc các phân đoạn protein tinh sạch và thực hiện phản ứng cắt bằng enzyme enterokinase để loại bỏ thioredoxin và đuôi histidine. Quá trình cắt bằng enzyme được thực hiện ở 25°C trong 16 giờ. Sau khi ω-CTX được tách khỏi protein dung hợp đã được tinh sạch bằng ly tâm lọc qua cột microcone 5 kDa. Cuối cùng ω-CTX được kiểm tra SDS-PAGE để xác định mức độ tinh sạch và làm khô bằng SpeedVac để cất giữ -25°C.

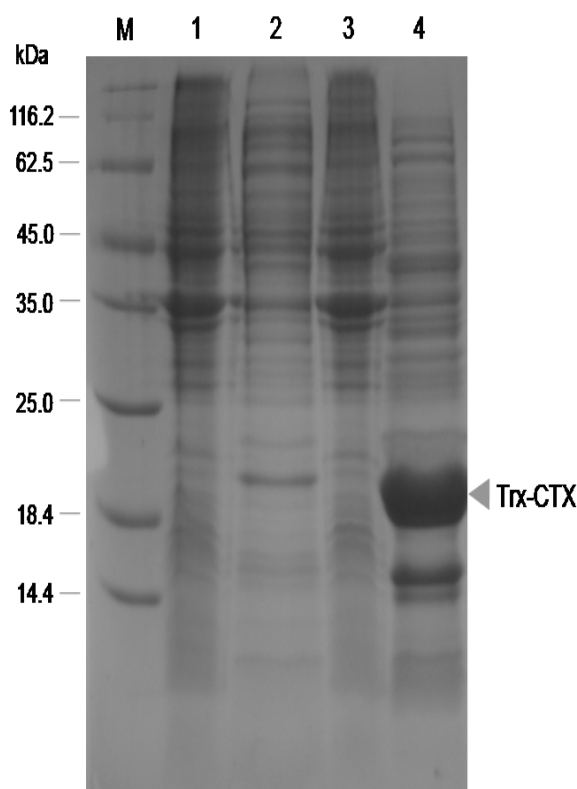
## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Kết quả thiết kế vector biểu hiện CTXpET32c



**Hình 1.** Kiểm tra thiết kế vector biểu hiện gen mã hóa ω-Conotoxin MVIIA

1. Vector tái tổ hợp CTXpET32c mang gen mã hóa Trx-CTX sau khi xử lý bằng NcoI và EcoRI; **M.** thang DNA chuẩn; **2.** Sản phẩm PCR, đoạn gen mã hóa ω-Conotoxin MVIIA; **3.** Vector tách dòng mang CTXpBT mang gen mã hóa ω-Conotoxin MVIIA sau khi xử lý bằng NcoI và EcoRI.



**Hình 2.** Kết quả biểu hiện Trx-CTX ở *E. coli*.

**M.** thang protein chuẩn; đường chạy 1 và 3 là protein tổng số của vi khuẩn trước khi cảm ứng; đường chạy 2 và 4 là protein tổng số của vi khuẩn sau khi cảm ứng 1 và 3 h.

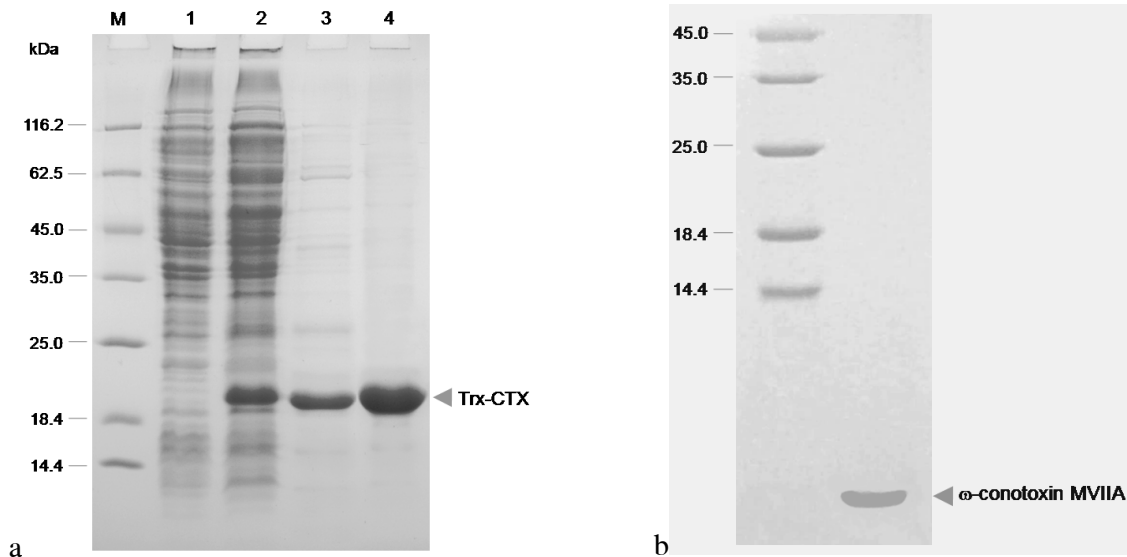
Gen mã hóa cho  $\omega$ -CTX sau khi đã được tạo dòng bằng vector pBT với trình tự được thiết kế có chứa các điểm cắt của các enzyme *NcoI* và *EcoRI*, đã được chuyển vào vector pET32c (+) để biểu hiện theo chiến lược đã mô tả ở phần phương pháp nghiên cứu. Vector tái tổ hợp này được ký hiệu là CTXpET32c đầu tiên được biến nạp vào chủng *E. coli* DH5 $\alpha$  để kiểm tra, rồi tiếp tục được biến nạp vào chủng *E. coli* BL 21 (DE3) để biểu hiện.

Để kiểm tra, các vector tái tổ hợp CTXpBT và CTXpET32c cùng đồng thời được xử lý với hai enzyme giới hạn là *NcoI* và *EcoRI* đối với các điểm cắt được thiết kế để tạo đầu dính tương hợp giữa đoạn gen cần chèn và vector. Kết quả phân cắt được trình bày trên hình 1. Có thể thấy, từ vector CTXpET32c và vector CTXpBT sau khi cắt đều cho 2 băng: băng của các vector

(cao hơn) tương ứng và băng thấp hơn có kích thước khoảng 100 bp tương đương với sản phẩm PCR, đoạn gen mã hóa cho phân tử  $\omega$ -CTX thành thực. Như vậy, thiết kế đã được thực hiện theo như chiến lược đã mô tả. Khung đọc của đoạn gen thiết kế cũng đã được kiểm tra qua kết quả đọc trình tự gen (không chỉ ra ở đây).

## 2. Kết quả biểu hiện protein dung hợp Trx-CTX ở *E. coli*

Sau khi vector tái tổ hợp CTXpET32c được biến nạp vào chủng *E. coli* BL21(DE3), một số dòng tế bào được lựa chọn để nghiên cứu sự biểu hiện bằng cách cảm ứng với IPTG nồng độ cuối cùng trong dịch nuôi tế bào là 1mM. Protein tổng số được biểu hiện từ dòng tế bào có cảm ứng và đối chứng không có cảm ứng được kiểm tra điện di biến tính trên gel polyacrylamide 12,6% có SDS.



**Hình 3.** Kết quả tinh chế  $\omega$ -conotoxin tái tổ hợp

**a.** Điện di SDS-PAGE kiểm tra các các phân đoạn protein dung hợp Trx-CTX (M: thang protein chuẩn; 1: protein tổng số trước khi cảm ứng; 2: protein tổng số sau khi cảm ứng bằng IPTG; 3 và 4 là các phân đoạn thu được sau sắc ký); **b.** Kết quả tinh chế  $\omega$ -CTX MVIIA sau khi cắt loại Trx và lọc qua microcone 5 kDa.

Kết quả điện di trên hình 2 cho thấy, ở đường chạy 1 và 3 là protein tổng số tại thời điểm 0h (trước khi cảm ứng). Ở đường chạy số 2 và 4 là protein tổng số tại thời điểm 1h và 3h sau khi cảm ứng bởi IPTG, xuất hiện một băng protein mới. Có thể thấy rõ là băng protein này chỉ mới xuất hiện sau 1h, nhưng đã rất đậm nét và dễ dàng nhận biết với kích thước khoảng 21 kDa so với thang protein chuẩn. Một điều đáng

chú ý là, đo đặc tính của vector biểu hiện pET32c(+), protein Trx-CTX được biểu hiện chủ yếu dưới dạng hòa tan. Hơn nữa, do được thiết kế có chứa đoạn 6xHis-tag cũng như các vị trí cắt của enterkinase ngay trong và trước vùng cắt gắn đa vị, protein/peptide dễ dàng được tinh sạch cho những nghiên cứu tiếp theo.

## 3. Kết quả tinh chế protein $\omega$ -CTX

Dựa trên tương tác ái lực giữa các gốc histidine với ion Ni của Sepharose chelating, các protein dung hợp có chứa His-tag sẽ được cố định lại trên cột sắc ký. Sự cạnh tranh giữa imidazole với các gốc histidine của protein sẽ giải phóng protein tái tổ hợp tại những phân đoạn đầu tiên. Vì  $\omega$ -CTX được dung hợp với 6 gốc histidine nên protein lai có thể được tinh sạch dễ dàng với chất giá Sepharose chelating. Sử dụng Imidazole nồng độ 500 mM thôi trực tiếp protein dung hợp Trx-CTX. Kết quả thể hiện trên hình 3a cho thấy, đường chạy số 2 (protein tổng số sau khi cảm ứng bởi IPTG) xuất hiện thêm 1 băng protein mới so với đường chạy số 1 (protein tổng số trước khi cảm ứng) có kích thước khoảng 21 kDa. Kích thước này phù hợp với tính toán lý thuyết về trọng lượng phân tử của Trx-CTX. Các phân đoạn protein được thời ra có nồng độ và mức độ tinh sạch khác nhau.

Ở phân đoạn thứ 2 và thứ 3 (hình 3a) chỉ có một băng protein duy nhất chứng tỏ quá trình sắc ký đã đạt được được độ tinh sạch cần thiết để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo. Lựa chọn các phân đoạn protein tinh sạch này tiến hành phản ứng phân cắt bằng enterokinase để thu nhận  $\omega$ -CTX, loại bỏ Trx.  $\omega$ -CTX được thu nhận từ hỗn hợp peptide sau khi tinh sạch bằng siêu lọc (cut-off) với cột microcone 5 kDa (chỉ những protein có kích thước nhỏ hơn 5 kDa mới đi qua cột). Kết quả điện di trên gel polyacrylamide cho thấy peptide  $\omega$ -CTX thu được sau khi đi qua cột microcone 5kDa đạt độ tinh sạch cao (Hình 3b). Cấu trúc của  $\omega$ -CTX tái tổ hợp đã được xác nhận qua phân tích khối phổ. Độ độc ( $LD_{50}$ ) và hoạt tính giảm đau của  $\omega$ -CTX cũng đã được thử nghiệm trên mô hình chuột nhắt trắng. Các kết quả này sẽ được trình bày ở bài báo tiếp theo.

### III. KẾT LUẬN

$\omega$ -conotoxin MIIA đã được thiết kế biểu hiện dưới dạng protein dung hợp Trx-CTX, có chứa đoạn His-tag và các điểm cắt của enterokinase, với kích thước khoảng 21kDa bằng hệ vector pET32c ở tế bào *E. coli* chủng

BL21(DE3). Protein Trx-CTX và  $\omega$ -conotoxin MIIA đã được tinh sạch bằng sắc ký ái lực và siêu lọc.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hỗ trợ kinh phí của đề tài “Khảo sát, xác định một số peptide có hoạt tính sinh dược quý từ sinh vật biển đặc hữu (ốc cối, hải miên) bằng các kỹ thuật proteomics” cấp Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2008-2009.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Becker S. and Terlau H.**, 2008: Journal Applied Microbiology and Biotechnology, 79: 1-9.
2. **Bùi Thị Huyền, Nguyễn Bích Nhi, Phan Văn Chi**, 2008: Tạp chí Công nghệ sinh học, 6(4A): 663-669.
3. **Can P., Weihua C. et al.**, 2009: Acta Biochim Biophys Sin., 41: 858-864.
4. **Canhui P. et al.**, 2007: Journal of Biotechnology, 128: 184-193.
5. **Lubbers N. L. et al.**, 2005: J. Cardiovasc Pharmacol., 46: 141-146.
6. **Miljanich G. P.**, 2004: Curr. Med. Chem., 11: 3029-3040.
7. **Olivera B. M.**, 2002: Ann. Rev. Ecol. Syst., 33: 25-47.
8. **Olivera B. M.**, 2006: J. Biol. Chem., 281: 31173-31177.
9. **Olivera B. M. and Teicher R. W.**, 2007: Molecular Interventions, 7(5): 251-260.
10. **Philippe F., Reto S.**, 2009: Current Opinion in Pharmacology, 9(5): 594-601.
11. **Quentin K. et al.**, 2008: Bioinformatics Applications Note, 24(3): 445-446.
12. **Staats P. S. et al.**, 2004: Jama, 291: 63-70.
13. **Terlau H. and Olivera B. M.**, 2004: Physiol. Rev., 84(1): 41-68.
14. **Zhang S. J. et al.**, 2003: J. Cardiovasc Pharmacol., 42: 764-771.

## EXPRESSION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT $\omega$ -CONOTOXIN MVIIA FROM *E. COLI*

BUI THI HUYEN, LE THI BICH THAO,  
NGUYEN BICH NHI, PHAN VAN CHI

### SUMMARY

Following the strategy of cloning  $\omega$ -conotoxin MVIIA ( $\omega$ -CTX) from *Conus magus* (*C. magus*), in this article, the expression and purification of the peptide is reported. For that, recombinant plasmid CTXpET32c was designed containing fusion gene encoding thioredoxin (as original) and  $\omega$ -CTX (Trx-CTX) that is linked by enterokinase restriction site, was transformed into the *E. coli* BL21 strain. The fusion protein, Trx-CTX combined to 6xHis-tag, is about 21 kDa in size, was expressed by induction with 1 mM IPTG and analyzed by SDS-PAGE. The recombinant protein was isolated and purified by Sepharose chelating affinity chromatography. SDS-PAGE results were an evidence to confirm the successful construction and expression of  $\omega$ -CTX in the fusion form with Trx in *E. coli* with vector CTXpET-32c. When it was treated by enterokinase to remove thioredoxin,  $\omega$ -CTX peptide was purified and obtained by using 5 kDa cutoff centrifugal filters.

**Key words:**  *$\omega$ -conotoxin MVIIA, Conus magus, E. coli, vector CTXpET32c(+).*

Ngày nhận bài: 7-12-2009