

NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN GEN IL-6 CỦA GÀ TRONG *E. COLI* BL21

Vũ Thị Thu Huyền*, Phạm Việt Cường, Trần Thị Kim Dung, Nguyễn Thị Kim Cúc

Viện Hóa sinh biển, (*)huyenvuibt@gmail.com

TÓM TẮT: Interleukin-6 (IL-6) là một cytokine đa chức năng có hoạt tính rộng và có tác động lên hầu hết các loại tế bào của hệ miễn dịch như tế bào B, tế bào T, tế bào gan, tiền tế bào máu và các tế bào của hệ thần kinh trung ương. IL-6 được sản sinh bởi nhiều loại tế bào khác nhau và hoạt động như một cytokine tiền viêm và kháng viêm. Để có thể biểu hiện hiệu quả trong hệ prokaryote, gen IL-6 của gà đã được tách dòng được tối ưu hóa bằng chương trình Optimum Gene Codon Optimization Analysis và hệ số thích ứng codon đã tăng lên 0,89. Đã thiết kế thành công vector biểu hiện pGS-21a-chIL-6 mang gen IL-6 của gà đã được tối ưu hóa. Protein IL-6 của gà đã biểu hiện trong tế bào BL21 khi cảm ứng bằng IPTG. Protein biểu hiện được kiểm tra trên gel polyacrylamid và thấy rằng protein có khối lượng phân tử khoảng 27 kDa, tương đương với tính toán lý thuyết và chủ yếu ở dạng inclusion bodies.

Từ khóa: Biểu hiện gen, chIL 6, Cytokine, Interleukin 6, tối ưu hóa trình tự gen.

MỞ ĐẦU

Interleukin-6 (IL-6) thuộc họ cytokine IL-6 và là một cytokine đa chức năng, giữ vai trò trong điều chỉnh đáp ứng miễn dịch, các phản ứng pha cấp và tạo máu (haematopoiesis), bao gồm tăng sinh và sản xuất kháng thể trong các tế bào lai, và có tiềm năng trở thành phụ gia phân tử cho vaccine và thay thế cho kháng sinh. IL-6 được sinh ra bởi nhiều loại tế bào khác nhau và có thể tác động lên tế bào B, tế bào T, tế bào gan (hepatocytes), tiền tế bào máu (haematopoietic progenitor cells) và các tế bào của hệ thần kinh trung ương [1, 3, 4, 10, 12, 13, 15]. IL-6 hoạt động như cytokine tiền viêm và chống viêm. IL-6 được tiết bởi tế bào T và đại thực bào để kích thích đáp ứng miễn dịch khi bị thương. Đối với đáp ứng miễn dịch của vật chủ tới nguồn bệnh, IL-6 cần cho sự kháng của chuột chống lại vi khuẩn, *Streptococcus pneumoniae*. IL-6 cũng là một “myokine”, một cytokine do cơ sinh ra và để đáp ứng lại sự co cơ bằng cách tăng hàm lượng. Ngoài ra, nguyên bào xương tiết IL-6 để kích thích sự tạo xương. Vai trò của IL-6 như một cytokine chống viêm được trung gian thông qua việc ức chế TNF- α và IL-1, và hoạt hóa IL-1ra và IL-10. IL-6 đại thực bào phản ứng lại các phân tử vi khuẩn đặc hiệu, gọi là các mẫu phân tử liên quan nguồn bệnh (PAMPs) và thông qua một loạt các tín hiệu, cảm ứng tăng sản xuất cytokine [2, 3, 9, 11].

Gần đây, gen IL-6 của gà (ChIL-6) đã được tách dòng từ dòng tế bào HD11 và ChIL-6 tái tổ hợp đã được tạo ra [2, 5, 6, 7, 9]. rchIL-6 tương tự

như rhIL-6 làm tăng sinh dòng tế bào lai 7TD1 phụ thuộc IL-6 của chuột và rchIL-6 cảm ứng tổng hợp corticosterone ở gà *in vivo*. Li và cs (2010) đã thành công trong tách dòng gen chIL-6 và thiết kế vector biểu hiện pET 32a(+)/chIL-6 trong *E. coli* [5]. Liu et al. (2009) [6] cho thấy rChIL-6 biểu hiện trong hệ eukaryot có thể làm tăng đáng kể hiệu quả miễn dịch của vaccine LaSota bệnh Newcastle. IL-6 có thể được sử dụng như một chỉ thị trạng thái miễn dịch chế phẩm kháng nguyên kháng chIL-6 sẽ là cơ sở để phát triển phương pháp huyết thanh học để phát hiện IL-6 của gà [5]. Gen ChIL-6 đã được tách dòng và gắn vào vector biểu hiện pET 32a(+) và protein tái tổ hợp đã biểu hiện thành công trong tế bào BL21 khi được cảm ứng bằng IPTG sau 4 giờ [5].

Scott et al. (2006) [9] đã sử dụng vector pMAL-c2 để tách dòng và biểu hiện gen chIL-6. rchIL-6 protein biểu hiện đã được tinh sạch sử dụng cột ái lực amylose.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Gen IL-6 của gà: Gen chIL-6 được chúng tôi thu nhận từ mô lá lách gà 1 tháng tuổi, tách dòng trong và lưu giữ trong plasmid pCR2.1. Tiến hành đọc trình tự và xử lý tối ưu hóa trình tự. Trình tự Interleukin-6 của gà sau khi tối ưu hóa (ch-IL6-opt) bằng phần mềm của hãng GenScript được chuyển vào vector tách dòng pUC57 (GenScript).

Chủng vi khuẩn: *Escherichia coli* DH5 α và BL21 (DE3) của hãng Invitrogen. Chủng *E. coli*

được nuôi ở 37°C trong môi trường Luria-Bertani lỏng hoặc rắn, bổ sung ampicillin khi cần thiết để chọn lọc và giữ plasmid tái tổ hợp.

Vector biểu hiện: Vector pGS-21a (GenScript) được sử dụng để thiết kế vector biểu hiện gen trong *E. coli*. Vector pGS-21a có khả năng biểu hiện mạnh protein tái tổ hợp, vector có promoter T7, được cài hai lần 6xHis và GST thuận lợi cho quá trình tinh sạch protein.

Thiết kế vector biểu hiện: Cặp mồi đặc hiệu được xây dựng để khuếch đại đoạn gen *chIL-6-opt* dài 726bp, trong đó mồi xuôi 5'-TATCCCATGGGCCGCCATGAACTTTACC GAAGG-3' có điểm cắt của enzyme giới hạn *Nco* I (gạch chân), và mồi ngược 5'-TCCGCTCGAGAGCGGAGAACGAGCGGG-3' có điểm cắt của enzyme giới hạn *Xho* I. PCR được tiến hành với template là plasmid DNA pUC57/*chIL-6-opt*, với thành phần: mỗi loại primer 1 µl, dNTP 2 µl, *taq* polymerase 0,5 µl, dung dịch đệm cho enzyme 2,5 µl, và template 2 µl. Chu trình nhiệt PCR: 94°C trong 2 phút, 30 chu kỳ của [94°C trong 30 giây, 64°C trong 45 giây, trong 1 phút], 72°C trong 8 phút, giữ mẫu ở 4°C.

Biểu hiện gen *chIL-6-opt*: Chủng *E. coli* BL21 chứa plasmid tái tổ hợp được nuôi lắc qua đêm trong môi trường LB ở 37°C. Dịch nuôi được cấy chuyển sang môi trường mới với tỉ lệ 1%, nuôi tiếp 3-4 giờ cho đến khi OD₆₀₀ đạt 0,6. Bổ sung IPTG 0,5M để cảm ứng biểu hiện gen trong 3 giờ ở 37°C. Thu tế bào bằng ly tâm 5000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút, rửa tế bào bằng PBS lạnh.

Tế bào được làm tan trong PBS lạnh bằng siêu âm, ly tâm 10000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút, tách cận và dịch nội. Protein tái tổ hợp được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE sau khi được biến tính ở 100°C trong 10 phút.

Phản ứng ELISA: Để khẳng định chắc chắn mẫu thu nhận được dương tính với kháng thể ChIL-6, chúng tôi thực hiện phản ứng ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay-Phản ứng hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme), sử dụng phương pháp ELISA Sandwich trực tiếp tóm bắt kháng nguyên (chicken Interleukin-6 ELISA kit- Cusabio).

Tiến hành phản ứng: Chủng *E. coli* BL21 chứa plasmid tái tổ hợp được nuôi lắc qua đêm trong môi trường LB ở 37°C, pha loãng các nồng độ 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶. Bổ sung 100 µl mẫu, đối chứng vào từng giếng có phủ sẵn kháng thể chIL-6, ủ 2h ở 37°C. Loại bỏ dịch, không rửa. Thêm 100 µl Biotin-antibody vào từng giếng, ủ 1h ở 37°C, loại bỏ dịch, rửa 3 lần bằng 200 µl wash buffer mỗi giếng. Thêm 100 µl HRP-avidin vào từng giếng, ủ 1h ở 37°C, rửa lại 5 lần bằng 200 µl wash buffer mỗi giếng. Thêm 90 µl cơ chất TMB, ủ 10-30 phút ở 37°C. Thêm 50 µl dung dịch dừng phản ứng vào từng giếng. Đo OD ở 450 nm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

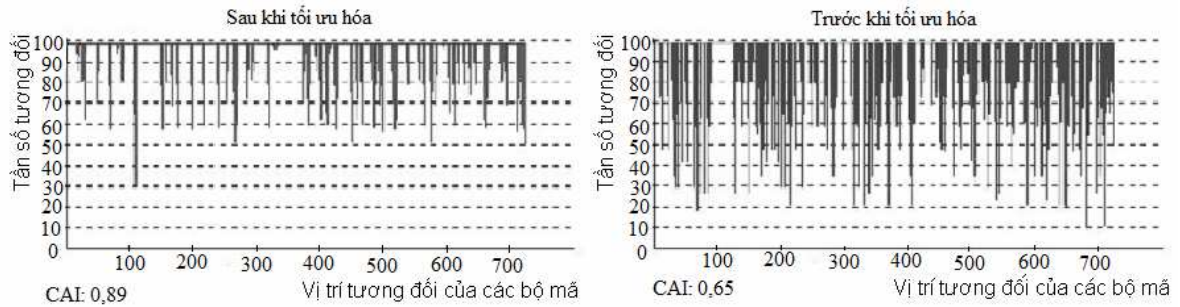
Tối ưu hóa trình tự gen *chIL-6* cho hệ biểu hiện procaryote

Hệ biểu hiện *E. coli* thường được lựa chọn để biểu hiện gen ngoại lai do một số ưu điểm như genome của chúng đã được nghiên cứu kỹ, và đây là hệ biểu hiện gen linh hoạt, dễ sử dụng, rẻ tiền, mức độ biểu hiện của gen ngoại lai cao, thường chiếm tới trên 30% protein tổng của tế bào. Mặc dù vậy, mức độ biểu hiện cao không phải bao giờ cũng đạt được, đặc biệt đối với gen có nguồn gốc từ các loài khác. Một trong rất nhiều nguyên nhân ảnh hưởng đến hiệu quả biểu hiện protein khác loại trong *E. coli* là mức độ sử dụng codon (biased codon usage). Ngoài ra, sự biểu hiện gen chứa các bộ mã (codon) hiếm gặp (rare codons) có thể dẫn đến những lỗi dịch mã, mà các codons này trong *E. coli* thường có rất nhiều trong khi đó ở các gen khác loại (từ eukaryot hoặc vi khuẩn archaea), vì vậy, cần phải tối ưu hóa gen trước khi biểu hiện trong *E. coli* [8].

Gen *IL-6* được tách dòng từ gà Việt Nam (Vietnamese Gallus gallus domestica Breed Ri), gồm 726 nucleotides, mã hoá cho 241 amino acid. Để biểu hiện tốt trong hệ thống *E. coli*, chuỗi nucleotide *chIL-6* của gà cần phải được chuyển đổi sang bộ mã của *E. coli*, nhưng phải đảm bảo trình tự amino acid không thay đổi. Vì vậy, chương trình Optimum Gene Codon Optimization Analysis (GenScript) đã được sử dụng để tìm kiếm bộ mã không phù hợp biểu hiện trong hệ procaryote và chuyển đổi sang bộ

mã của *E. coli* (appendix). Sau khi chuyển đổi, hệ số CAI (Codon Adaptation Index), thay đổi từ CAI: 0,65 thành CAI: 0,89 (CAI: 1,0 được coi là hoàn thiện với mức độ biểu hiện cao nhất) (hình 1). Sau khi dịch mã gen đã được thay đổi

sang protein và so sánh với chIL-6 nguyên thủy thấy rằng, tỷ lệ tương đồng amino acid là 100%. Như vậy, sự thay đổi một số nucleotides không ảnh hưởng đến trình tự amino acid của protein biểu hiện.



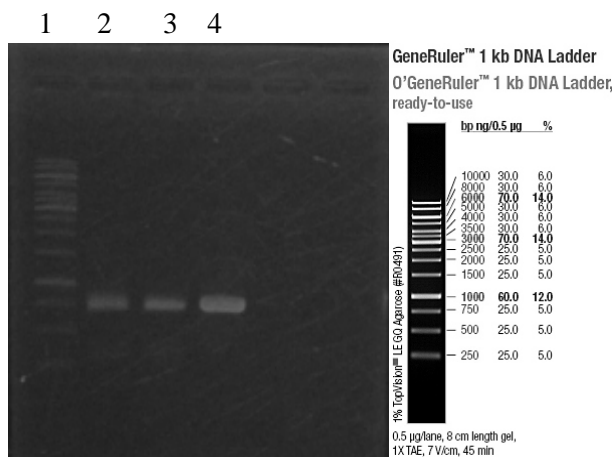
Hình 1. Hệ số thích ứng codon CAI (Codon Adaptation Index) của gen *chIL-6* trước và sau tối ưu hóa.

Thiết kế vector biểu hiện pGS-21a/*chIL-6-opt*

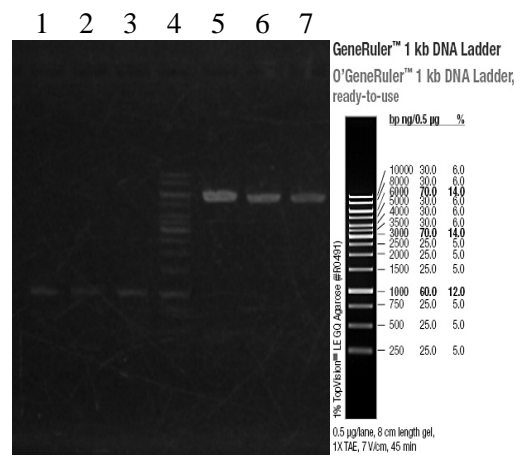
Gen *chIL-6* sau khi thay đổi mã dịch protein cho phù hợp (*chIL-6opt*) với điều kiện biểu hiện trong hệ procaryot được tổng hợp và đưa vào plasmid pUC57 (GenScript) để giữ dòng. Sử dụng cặp mồi được thiết kế và template là plasmid pUC57/*chIL-6opt*, PCR đã được tiến hành theo phương pháp mô tả và sản phẩm PCR được kiểm tra trên agarose gel (hình 2). Để tạo plasmid mang gen *chIL-6opt*, sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch và plasmid pGS-21a đều được cắt bằng enzymes giới hạn *Nco I* và *Xho I*, sau đó điện di trên gel agarose 1% (hình 3). Tinh sạch sản phẩm cắt và tiến hành phản ứng

ligation để gắn gen *chIL-6opt* vào vector biểu hiện pGS-21a nhờ T4-DNA ligase. Plasmid tái tổ hợp pGS-21a/*chIL-6opt* được biến nạp vào chủng *E. coli* BL21 khả biến, chọn các dòng mang plasmid tái tổ hợp bằng ampicillin. Cắt plasmid tái tổ hợp từ các dòng chọn lọc *E.coli* tái tổ hợp bằng enzymes giới hạn *Nco I* và *Xho I* và điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra kết quả gắn gen (hình 4).

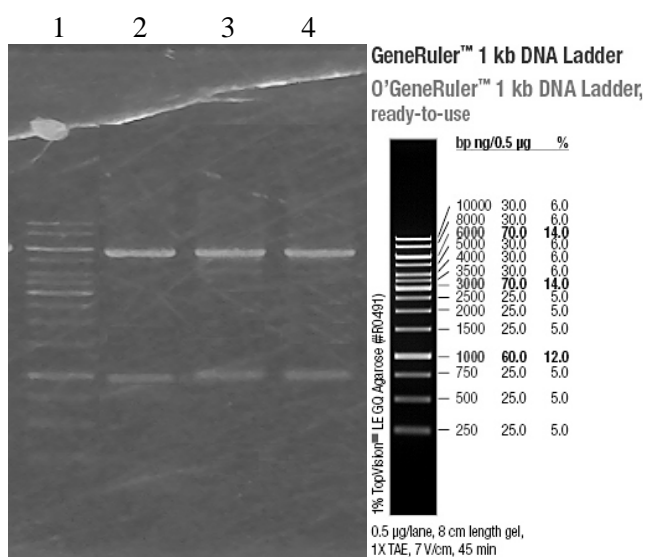
Kết quả kiểm tra DNA plasmid bằng xử lý với 2 enzyme *Nco I* và *Xho I* trên hình 4 cho thấy, gen *chIL-6-opt* đã gắn được vào vector pGS-21a.



Hình 2. Điện di đồ sản phẩm PCR
1. Marker Fermentas; 2, 3, 4. Sản phẩm PCR.

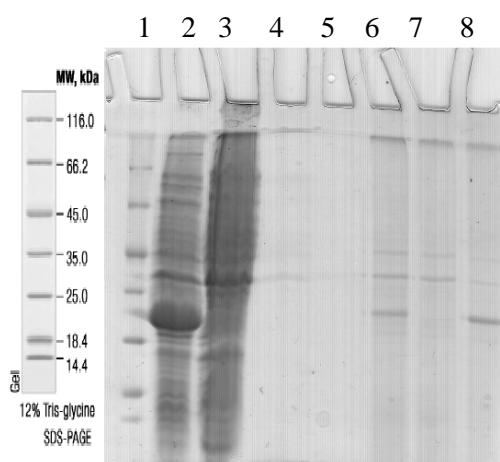


Hình 3. Điện di đồ sản phẩm cắt bằng *Nco I* và *Xho I* của sản phẩm PCR (1, 2, 3) và plasmid pGS-21a (5, 6, 7)



Hình 4. Điện di đồ sản phẩm cắt của plasmids pGS-21a/chIL-6opt

1. Marker Fermentas; 2, 3. Sản phẩm cắt của plasmids pGS-21a/chIL-6opt bằng Nco I và Xho I



Hình 5. Điện di đồ SDS-PAGE của dịch nuôi cấy

1. Marker protein (Fermentas); 2. Dịch chứa protein của tế bào nuôi cấy mang pGS-21a/chIL-6-opt và được cảm ứng bằng IPTG; 3. Dịch chứa protein của tế bào nuôi cấy mang pGS-21a/chIL-6-opt không cảm ứng; 4. Dịch chứa protein của tế bào nuôi cấy mang pGS-21a/chIL-6-opt được cảm ứng; 5. Dịch nuôi cấy của dòng tế bào không được cảm ứng; 7. Dịch chứa protein của tế bào nuôi cấy mang pGS-21a/chIL-6-opt cảm ứng sau khi phá bằng siêu âm; 8. Cặn ly tâm dịch chứa protein của tế bào nuôi cấy mang pGS-21a/chIL-6-opt cảm ứng sau khi phá bằng siêu âm.

Biểu hiện gen *chIL-6-opt* trong BL21

Dòng tế bào mang plasmid tái tổ hợp sau khi chọn lọc được nuôi trong môi trường Luria-Bertani lỏng, bổ sung ampicillin, cảm ứng bằng IPTG và thu sinh khối. Sinh khối tế bào được hòa trong nước cất, bổ sung đệm loading buffer và chất biến tính protein (DTT), biến tính ở

100°C trong 10 phút. Điện di protein tổng thu được trên SDS-PAGE để kiểm tra khả năng biểu hiện của gen *chIL-6-opt* trong tế bào *E. coli* BL21(DE3) (hình 5).

Kết quả điện di cho thấy, protein có trọng lượng phân tử khoảng 27 kDa (trọng lượng phân tử được tính toán theo lý thuyết của

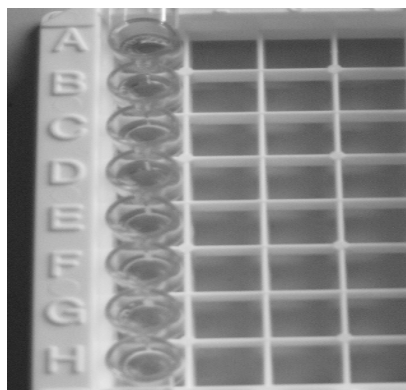
protein tái tổ hợp chIL-6-opt) được biểu hiện khá rõ ở dòng chọn lọc (giếng 2). Dòng tế bào *E. coli* mặc dù được xác định mang plasmid tái tổ hợp nhưng không được cảm ứng bằng IPTG sẽ không tổng hợp chIL-6 (giếng 3). Protein tái tổ hợp chIL-6-opt) được tổng hợp trong trạng thái thể vùi, vì vậy, trong dịch nuôi cấy không xuất hiện bằng tương ứng ChIL-6-opt tái tổ hợp (giếng 4). Để xác định trạng thái hòa tan của protein, tế bào *E. coli* sau cảm ứng được thu hồi, phá màng tế bào bằng siêu âm và ly tâm tách phần dịch nổi và phần cặn. Cả hai phần đều được bổ sung dung dịch đệm loading buffer, dịch biến tính DTT và biến tính 100°C trong 10 phút, sau đó kiểm tra bằng điện di trên gel

polyacrylamid. Có thể thấy, lượng protein tái tổ hợp hòa tan rất ít (giếng 7).

Phản ứng ELISA

Kết quả phản ứng Elisa cho thấy, dịch nuôi chủng *E. coli* BL21 chứa plasmid tái tổ hợp được nuôi lắc qua đêm trong môi trường LB ở 37°C, pha loãng các nồng độ 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} và 10^{-6} .

Gen chIL-6 của gà Việt Nam (Vietnamese Gallus gallus domestica Breed Ri) được tách dòng, gắn vào vector biểu hiện pGS 21a và protein tái tổ hợp đã biểu hiện tốt khi được cảm ứng bằng IPTG trong *E. coli* BL21 (DE3).



Ký hiệu	Nồng độ pha loãng	OD
A	10^0	0,336
B	10^{-1}	0,304
C	10^{-2}	0,279
D	10^{-3}	0,242
E	10^{-4}	0,205
F	10^{-5}	0,163
G	10^{-6}	0,102
H	Chứng âm	0,013

Hình 6. Kết quả phản ứng ELISA

KẾT LUẬN

Gen IL-6 của gà đã được tối ưu hóa cho sự biểu hiện trong tế bào prokaryote bằng chương trình Optimum Gene Codon Optimization Analysis và đã làm tăng hệ số thích ứng codon (CAI) lên từ 0,65 đến 0,89. Đã tách dòng và thiết kế thành công vector biểu hiện pGS-21a-chIL-6 mang gen chIL-6 sau khi tối ưu hóa. Protein tái tổ hợp đã biểu hiện trong tế bào *E. coli* dòng BL21(DE23) khi được cảm ứng bằng IPTG. Protein biểu hiện đã được kiểm tra trên gel polyacrylamid có khối lượng phân tử khoảng 27kDa, phù hợp với lý thuyết và chủ yếu trong trạng thái inclusion body không tan.

Lời cảm ơn: Chúng tôi chân thành cảm ơn chương trình Công nghệ Sinh học nông nghiệp và Bộ Nông nghiệp và phát triển nông thôn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Giansanti F., Giardi M. F. and Botti D.,

2006. Avian Cytokines - An Overview. Current Pharmaceutical Design, 12(24): 3083-3099.

- Pamela J. Ferro, Christina L. Swaggerty, Haiqi He, Lisa Rothwell Pete Kaiser, Michael H. Kogut, 2005. Recombinant chicken IL-6 does not activate heterophils isolated from day-old chickens *in vitro*. Developmental and Comparative Immunology, 29: 375-383.
- Johnson M. A., Pooley C., Lowenthal J. W., 2000. Delivery of avian cytokines by adenovirus vectors. Dev. Comp. Immunol., 24(2-3): 343-354.
- Tadamitsu Kishimoto, 2006. Proceedings: Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. Arthritis Research & Therapy, 8(Suppl 2): S2.
- Min Li, Yuanping Wang, Nianli Zou, Sanjie Cao, Xintian Wen and Yong Huang, 2010.

- The polyclonal antibody against chicken interleukin-6 prepared by immunization of recombinant eukaryotic plasmid can react efficiently with its procaryotic expression protein. *J. Anim. Veter Adv.*, 9(21): 2679-2684.
6. Liu R. L., N. L. Zou, H. N. Wang, P. Liu, Y. Huang, 2009. Construction of eukaryotic expression plasmids encoding chicken interleukin 6 and study on its immunoenhancement on Newcastle disease lasota vaccine. *Acta. Vet. Zootechnica Sinica*, 40: 93-97.
 7. Norihisa Nishimichi, Masayoshi Aosasa, Tsuyoshi Kawashima, Hiroyuki Horiuchi, Shuichi Furusawa, Haruo Matsuda, 2005. Biological activity of recombinant chicken interleukin-6 in chicken hybridoma cells. *Veterinary Immunol Immunopath.*, 106: 97-105.
 8. El-Rashdy, M. Redwan, 2006. The optimal gene sequence for optimal protein expression in *Escherichia coli*: Principle requirements. *Arab. J. Biotech.*, 9(3): 493-510.
 9. T. R. Scott, H. S. Lillehoj, 2006. Monoclonal antibodies against chicken interleukin-6. *Veterinary Immunol Immunopath.*, 114: 173-177.
 10. Kirsten Schneider, Reinhard Klaas, Bernd Kaspers and Peter Staeheli, 2001. Chicken interleukin-6: cDNA structure and biological properties. *Eur. J. Biochem.*, 268: 4200-4206.
 11. Smolen J. S., Maini R. N., 2006. Interleukin-6: a new therapeutic target. *Arthritis Res. Ther.*, 8 (Suppl 2): S5.
 12. Jacques Van Snick, 1990. Interleukin-6: An overview. *Annu. Rev. Immunol.*, 8: 253-278.
 13. Klein B., Wijdenes, X. G. Zhang, M. Jourdan, J. M. Boiron, J. Brochier, J. Liautard, M. Merlin, C. Clement and B. Morel-Fournier, 1991. Murine anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for a patient with plasma cell leukemia. *Blood*, 78: 1198-1204.
 14. Xie C. H., R. Q. Yan, B. A. Cui, X. L. Zhao, Z. M. Wu, Z. L. Zhang and J. Zhang, 2008. Enhancement of immune response to vaccine by recombinant chicken interleukin-6. *Chinese J. preventive Vet. Med.*, 30.
 15. [Http://www.bio.davidson.edu/Courses/Immunology/Students/Spring2003/Sole/myfavprotein.htm](http://www.bio.davidson.edu/Courses/Immunology/Students/Spring2003/Sole/myfavprotein.htm)

EXPRESSION OF CHIL-6 GENE ENCODING CHICKEN INTERLEUKIN-6 IN *E. COLI* BL21 (DE3)

Vu Thi Thu Huyen, Pham Viet Cuong, Tran Thi Kim Dung, Nguyen Thi Kim Cuc

Marine Biochemical Institute, VAST

SUMMARY

Interleukin-6 (IL-6) is a multifunctional cytokine having a wide range of activity and has an impact on almost immune system cells such as B cells, T cells, hepatocytes, haematopoietic progenitor cells and cells of the central nervous system. IL-6 is produced by many different cell types and acts as pro- and antiinflammation cytokine. For effective expression in prokaryotic system, the cloned Vietnamese chIL-6 gene was optimized using Optimum Gene Codon Optimization Analysis and the CAI was improved up to 0.89. The expression vector pGS-21a-chIL-6 containing optimized chIL-6 gene was successfully constructed. By induction with IPTG, recombinant chIL-6 protein was expressed in BL21. The ELISA results and Polyacrylamid gel showed that expressed protein has molecular weight about 27 kDa, corresponding to theoretical calculation and mainly in inclusion bodies state.

Keywords: Chicken Interleukin 6, Cytokine, Expression, ELISA, Genentic optimization.

Ngày nhận bài: 21-6-2011