

## BIỂU HIỆN PROTEIN HUỖNH QUANG XANH (GFP) TRONG TẾ BÀO ĐỘNG VẬT CÓ VÚ NUÔI CÂY

Nguyễn Hải Hà, Lê Thị Thu Hiền, Nông Văn Hải

Viện Công nghệ sinh học

### TÓM TẮT

Tế bào động vật có vú nuôi cấy đã được sử dụng rộng rãi làm cơ sở sản xuất protein tái tổ hợp do khả năng biến đổi hậu dịch mã protein của chúng. Một số dòng tế bào bắt nguồn từ chuột hoặc người như tế bào buồng trứng chuột hamster Trung Quốc (Chinese hamster ovary, CHO), tế bào thận chuột hamster (baby hamster kidney-BHK) hay tế bào thận phôi người (human embryonic kidney-HEK) thường được sử dụng để biểu hiện các protein phức tạp. Mặc dù số dòng tế bào khá đa dạng nhưng có đến gần 70% được phẩm tái tổ hợp hiện nay được tạo ra từ tế bào CHO. Trong nghiên cứu này, để thiết lập hệ biểu hiện gen trong tế bào CHO, gen mã hóa protein huỳnh quang xanh (green fluorescence protein, GFP) đã được chọn làm đối tượng biểu hiện. Vector pEGFP-N2 mang cấu trúc biểu hiện gen *gfp* được đưa vào tế bào nhờ calcium phosphate hoặc lipofectamin 2000. Bốn mươi tám giờ sau khi biến nạp, biểu hiện của GFP trong tế bào đã được kiểm tra nhờ cường độ phát sáng của nó dưới kính hiển vi huỳnh quang. Số tế bào được biến nạp đạt khoảng 50 - 60% tổng số tế bào. Dòng tế bào chuyển gen ổn định biểu hiện mạnh GFP đã chọn lọc bằng kháng sinh geneticine và đặt tên CHO-S/GFP. Các kết quả này đã cho thấy khả năng ứng dụng các kỹ thuật nuôi cấy tế bào hiện đại như biểu hiện tạm thời và phát triển dòng tế bào chuyển gen ổn định trong nghiên cứu biểu hiện các protein tái tổ hợp có hoạt tính sinh học trong hệ tế bào CHO.

**Từ khóa:** Biểu hiện gen, protein huỳnh quang xanh (GFP), nuôi cấy tế bào động vật, tế bào buồng trứng chuột hamster Trung Quốc (CHO), vector biểu hiện

### MỞ ĐẦU

Trong 20 năm qua, sản xuất các protein tái tổ hợp đã trở thành một công nghệ quan trọng tập chung chính vào các sản phẩm là dược phẩm sinh học để ứng dụng trong y học. Hầu hết các protein tái tổ hợp dùng để chữa bệnh là những phân tử phức tạp. Để giữ được hoạt tính tự nhiên, chúng cần được biến đổi hậu dịch mã. Các biến đổi này lại chỉ được thực hiện chính xác bởi các tế bào động vật có vú. Do vậy, các tế bào động vật có vú nuôi cấy như tế bào buồng trứng chuột hamster Trung Quốc (Chinese hamster ovary-CHO), tế bào thận chuột hamster (baby hamster kidney-BHK) hay tế bào thận phôi người (human embryonic kidney-HEK) đã trở thành hệ biểu hiện lý tưởng để tạo ra các protein tái tổ hợp phức tạp (Wurm, 2004; Bhopale, Nanda, 2005). Trong số các dược phẩm được phê chuẩn bởi Cơ quan Quản lý Dược phẩm và Thực phẩm Hoa Kỳ (FDA), có tới hơn 70% sản phẩm được tạo ra từ CHO do quy trình công nghệ sản xuất trên tế bào này đã được nghiên cứu kỹ. Lượng protein tái tổ hợp sản xuất từ một dòng tế bào chuyển gen ổn định có thể lên tới hàng kg (Rosser *et al.*, 2005).

Hiệu quả chuyển gen vào tế bào là một trong các

yếu tố quyết định mức độ biểu hiện của protein tái tổ hợp. Nhiều phương pháp đưa DNA vào tế bào động vật có vú đã được nghiên cứu và phát triển như sử dụng calcium phosphate, xung điện hay các chất có bản chất lipid. Sử dụng calcium phosphate có ưu điểm là giá thành rẻ nhưng thường cho hiệu quả biến nạp thấp. Phương pháp xung điện tuy hiệu quả hơn nhưng lại đòi hỏi đầu tư thiết bị và còn có nguy cơ nhiễm gây nhiễm tế bào. Phương pháp sử dụng các chất lipid như DMRIE, Fugene, geneporter và lipofectamine 2000 tuy giá thành cao nhưng có hiệu quả biến nạp vượt trội. Khi so sánh hiệu quả biến nạp của các lipid này trên dòng tế bào CHO-S, Rosser và cộng sự đã chứng minh lipofectamine 2000 có khả năng đưa DNA vào tế bào tốt nhất (Rosser *et al.*, 2005).

Một số protein chỉ thị thường được dùng làm đích nghiên cứu cho các thí nghiệm mang tính khởi động, trong đó có protein huỳnh quang xanh (green fluorescence protein, GFP). Gen mã hóa GFP lần đầu được phân lập năm 1992 từ con sứa có tên *Aequorea victoria* (Prasher *et al.*, 1992). Đặc điểm cấu trúc phân tử GFP cho phép nó tự phát sáng trong bất kỳ sinh vật nào mà nó được biểu hiện. Hơn nữa, GFP thường không làm thay đổi chức năng và phân bố của protein

lai với nó trong tế bào. Do vậy, GFP đã được dùng làm công cụ nghiên cứu các hiện tượng trong tế bào và cơ thể sống như: biểu hiện gen, phân bố và chức năng của protein, tương tác giữa các protein, phân chia tế bào, sao chép và tổ chức nhiễm sắc thể, các con đường vận chuyển trong tế bào... Ngoài ra, các cảm biến đo giá trị pH, nồng độ  $Ca_{2+}$  và các đặc điểm cần thiết ở bên trong tế bào sống cũng đã được tạo ra nhờ các biến thể của GFP. Tầm quan trọng của GFP đã được công nhận khi hội đồng Nobel trao giải thưởng Nobel hóa học cho các công trình phát hiện và phát triển GFP ([http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2008/](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/)).

Ở nước ta, hàng loạt protein tái tổ hợp đã được biểu hiện thành công trên các hệ biểu hiện vi khuẩn như: Trichobakin, RIP, interleukin-2, mini-proinsulin (Nguyễn Thúy Hà *et al.*, 2003; Nguyễn Đình Cường *et al.*, 2003; 2004; Nguyễn Nam Long *et al.*, 2005; Bùi Thị Huyền *et al.*, 2005; Đặng Trần Hoàng *et al.*, 2005; Chu Kỳ Nam *et al.*, 2005). Ngoài ra, các nghiên cứu tạo vaccine tái tổ hợp cũng đang được quan tâm nghiên cứu (Lê Trần Bình, Cao Huyền Trang, 2005). Tuy nhiên, cho đến nay chưa có một công bố nào về biểu hiện protein tái tổ hợp trên hệ tế bào động vật nuôi cấy ở nước ta.

Trong công trình này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu thiết lập hệ biểu hiện gen trong tế bào động vật nuôi cấy. Dòng tế bào CHO-S có khả năng đáp ứng với môi trường nuôi thiếu huyết thanh đã được chọn làm vật chủ. Vector mang gen *gfp* đã được đưa vào tế bào CHO để biểu hiện tức thời GFP. Dòng tế bào chuyển gen GFP ổn định đã được sàng lọc bằng kháng sinh cho cho mức độ biểu hiện protein tương đối cao. Những kết quả này tạo tiền đề cho các nghiên cứu biểu hiện các protein được phẩm nhằm phục vụ cho việc bảo vệ sức khỏe con người.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Dòng tế bào CHO-S, môi trường nuôi và hóa chất cần thiết được mua từ hãng Invitrogen.

Plasmid pEGFP-N2 (Clontech) đã nhận được từ Phòng Hóa sinh Y học và Sinh học phân tử, Đại học Greifswald, Cộng hòa Liên bang Đức.

### Phương pháp

#### Nuôi cấy tế bào CHO-S

Tế bào CHO-S được nuôi cấy trong môi trường

DMEM chứa 10% huyết thanh bê (Fetal bovine serum-FBS), 0,1 mM hỗn hợp các amino acid không thiết yếu (non-essential amino acids) và 1% kháng sinh penicillin/streptomycin. Điều kiện nuôi tế bào là 37°C và 5%  $CO_2$ .

#### Tách chiết và biến nạp plasmid vào tế bào

Plasmid được tách chiết từ 100 ml dịch nuôi tế bào qua đêm theo phương pháp Sambrook và Russell (2001). Sau đó, plasmid được tinh sạch lại bằng cách chiết với phenol. Nồng độ cũng như độ tinh sạch của plasmid được xác định nhờ đo giá trị OD ở bước sóng 260 và 280 nm.

DNA plasmid được đưa vào tế bào bằng phương pháp sử dụng lipofectamine 2000 (invitrogen). Một ngày trước khi biến nạp, tế bào được cấy chuyển vào đĩa có đường kính 35 mm sao cho đến thời điểm biến nạp tế bào đạt 90% độ liên kết. Các bước biến nạp được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng của lipofectamine 2000.

#### Đánh giá biểu hiện gen mã hóa GFP

Thiết bị dùng để đánh giá biểu hiện protein GFP là kính hiển vi huỳnh quang Eclipse 80i của hãng Nikon. Sau khi biến nạp 48 h, các tế bào được quan sát trên kính hiển vi dưới nguồn huỳnh quang bước sóng 450 - 490 nm để đánh giá mức độ biểu hiện của GFP.

#### Chọn dòng tế bào biểu hiện ổn định GFP

Để chọn dòng tế bào biểu hiện ổn định GFP, các tế bào sau biến nạp 48 h được chia dòng và được nuôi trong môi trường có bổ sung 1 mM/ml Geneticin. Các đĩa nuôi tế bào được loại bỏ môi trường cùng tế bào chết và thay môi trường bổ sung geneticine mới 3 ngày một lần.

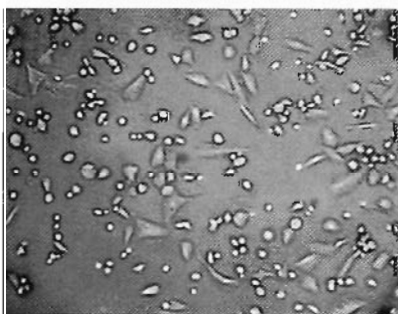
## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Nuôi cấy ổn định tế bào CHO-S

Với mục đích sưu tập và nuôi một dòng tế bào phát triển ổn định để phục vụ cho các nghiên cứu tạo protein tái tổ hợp, chúng tôi đã chọn tế bào CHO-S của hãng Invitrogen. Dòng tế bào này có nguồn gốc từ dòng CHO-K1, được chọn lọc theo hướng thích nghi linh hoạt trong các điều kiện nuôi khác nhau. Ở điều kiện nuôi tĩnh trong môi trường có bổ sung huyết thanh, tế bào CHO-S sống bám lớp mỏng trên bề mặt đĩa hoặc bình nuôi. Khi chuyển sang điều kiện nuôi lắc trong môi trường không có huyết

thanh, tế bào sống ở dạng huyền phù. Đây là một ưu thế quan trọng trong nghiên cứu sản xuất các protein tái tổ hợp do nó mang lại hiệu quả biểu hiện cao và giảm được chi phí cho môi trường nuôi cấy (Rosser *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2009).

Sau khi nhận được tế bào ở dạng đông lạnh, chúng tôi đã tiến hành nuôi phục hồi tế bào này bằng môi trường DMEM có bổ sung huyết thanh. Điều kiện nuôi là tủ ấm 37°C và 5% CO<sub>2</sub>. Sau 14 ngày, các tế bào phát triển đạt 70% bề mặt nuôi cấy (Hình 1) và bắt đầu được chia thành 2 bình nuôi. Các tế bào được duy trì ổn định bằng cách thay môi trường mới trung bình 3 ngày một lần và chia dòng mỗi khi các tế bào phát triển khoảng 80 - 90% bề mặt nuôi. Sau 2 - 4 thế hệ, 1 nửa số tế bào đã được giữ dòng và bảo quản ở -80 °C. 7 ngày sau khi giữ dòng, 1 ống tế bào đã được nuôi phục hồi để kiểm tra khả năng sống sót. Kết quả là các tế bào phát triển trở lại chỉ sau 3 ngày nuôi phục hồi. Như vậy, việc nuôi ổn định và lưu giữ dòng tế bào CHO-S đã được thực hiện thành công. Các tế bào này được sử dụng cho các nghiên cứu chuyển gen vào tế bào và biểu hiện protein tái tổ hợp.



**Hình 1.** Tế bào CHO-S. Tế bào CHO-S được nuôi dạng lớp mỏng trong môi trường DMEM có bổ sung huyết thanh (vật kính 10x).

### Chuẩn bị vector chuyển gen

Trong nghiên cứu này, vector pEGFP-N2 mang gen mã hóa cho GFP đã được dùng để đưa vào tế bào. Bản đồ của vector này được mô tả trên hình 2. Hai đột biến trên thay thế Phe-64-Leu và Ser-65-Thr được tạo ra nhằm tăng cường khả năng phát sáng của protein này. Biểu hiện của đoạn gen *gfp* được điều khiển bởi immediate early CMV promoter -P<sub>CMV IE</sub> có nguồn gốc từ cytomegalovirus. Giữa promoter và gen *gfp* có một vùng cắt gắn đa vị (MCS) cho phép đưa một đoạn gen mang mã có cùng khung đọc mở

với *gfp* để tạo ra protein lai với GFP. Nhờ khả năng phát sáng của GFP mà người ta có thể dễ dàng nghiên cứu mức độ biểu hiện, vị trí phân bố và hoạt động của protein lai trong tế bào. Trên vector pEGFP-N2 còn có cấu trúc biểu hiện gen kháng neomycin/kanamycin cho phép chọn dòng tế bào chuyển gen ổn định nhờ kháng sinh chọn lọc geneticine (G418).

Để đạt hiệu quả biểu hiện protein tái tổ hợp cao thì plasmid dùng cho biến nạp phải được tinh sạch với nồng độ cao. Chúng tôi đã tiến hành tách chiết plasmid và tinh sạch bằng phương pháp chiết phenol. Plasmid sau đó được kiểm tra chất lượng và nồng độ trên máy đo OD ở các bước sóng 260 và 280 nm. Tỷ lệ giá trị OD<sub>260/280</sub> >1,8 chứng tỏ plasmid tách được đủ tinh sạch cho bước biến nạp gen vào tế bào (Hình 2).

### Biểu hiện tức thời GFP trong tế bào CHO-S

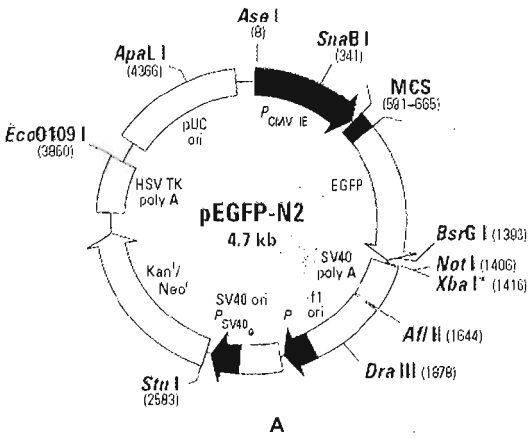
Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng lipofectamine 2000 để biến nạp pEGFP vào tế bào CHO-S trên các đĩa petri có đường kính 35 mm. Bốn tám giờ sau khi biến nạp, tế bào được kiểm tra biểu hiện GFP trên kính hiển vi. Dưới nguồn sáng có bước sóng  $\lambda = 450 - 490$ , một số tế bào đã phát sáng màu xanh lá cây đặc trưng của GFP. Tỷ lệ số tế bào phát sáng/tế bào không phát sáng khoảng 50 - 60% tương ứng với hiệu quả biến nạp (Hình 3). Phương pháp calcium phosphate cũng đã được thử dùng để biến nạp. Kết quả biểu hiện GFP cho thấy hiệu quả biến nạp của phương pháp này chỉ đạt khoảng 15 - 20%, thấp hơn nhiều so với phương pháp sử dụng lipofectamine 2000. Như vậy, chúng tôi đã đưa được DNA plasmid vào tế bào CHO-S với hiệu quả tương đối cao và biểu hiện thành công GFP trong tế bào này. Tuy nhiên, đây mới chỉ là bước biểu hiện tạm thời của protein này bởi vì theo thời gian, biểu hiện protein tái tổ hợp có thể sẽ mất dần. Để đạt được mức biểu hiện ổn định của protein đích phải tiến hành chọn dòng tế bào mang gen tái tổ hợp bền vững.

### Chọn dòng tế bào biểu hiện ổn định GFP

Để xác định nồng độ kháng sinh thích hợp cho việc chọn dòng tế bào, chúng tôi đã thử nuôi tế bào CHO-S với một seri các nồng độ geneticine khác nhau (0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25 và 1,50 mM/ml môi trường). Kết quả cho thấy các nồng độ 0,75, 1,00 mM/ml của geneticine đều có khả năng giết tế bào trong 7 ngày. Do vậy, tế bào biến nạp plasmid pEGFP-N2 đã được nuôi liên tục với môi trường bổ sung 1 mM/ml geneticine trong 21 ngày. Kết quả là chúng tôi đã thu được một quần thể tế bào có khả năng sinh trưởng ổn định trong môi trường có

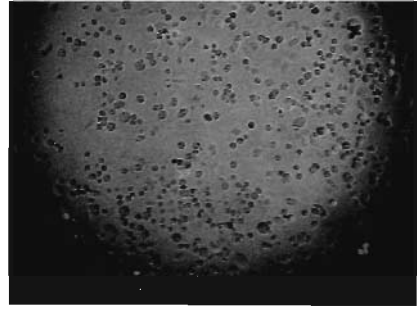
geneticine và biểu hiện GFP ở mức độ rất cao (Hình 4). Các tế bào này được đặt tên CHO/GFP và giữ

đồng trong nitrogen lỏng cho mục đích nghiên cứu lâu dài.

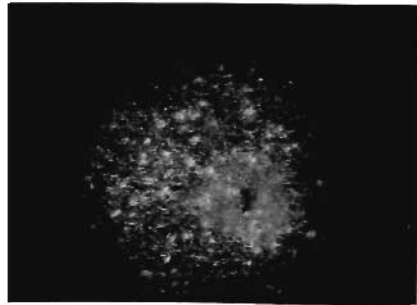
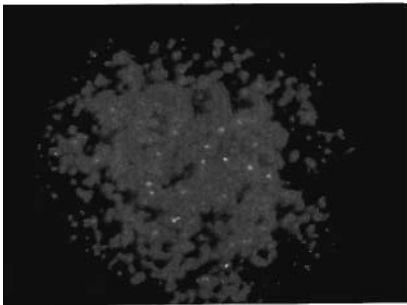


Plasmid	OD <sub>260/280</sub>	Nồng độ (mg/ml)
pEGFP-N2 (1)	1,88	0,278
pEGFP-N2 (2)	1,84	0,302
pEGFP-N2 (3)	1,83	0,151

**Hình 2.** Plasmid sử dụng cho chuyển gen. **A.** Bản đồ của plasmid pEGFP-N2 của hãng Clontech. **B.** Chất lượng và nồng độ plasmid sau khi tinh sạch.



**Hình 3.** Biểu hiện tức thời GFP trong tế bào CHO-S. Tế bào CHO-S được biến nạp với vector pEGFP-N2. Bốn tám giờ sau biến nạp, tế bào được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang Nikon Eclipse 80i (vật kính 10x). **A.** Dưới ánh sáng huỳnh quang ( $\lambda = 450 - 490$  nm). **B.** Dưới ánh sáng huỳnh quang kết hợp ánh sáng trắng.



**Hình 4.** Biểu hiện ổn định GFP trong tế bào CHO-S. Tế bào CHO-S được biến nạp với vector pEGFP-N2 và chọn lọc trong môi trường nuôi bổ sung 1 mM geneticine. Các tế bào biểu hiện ổn định GFP được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang Nikon Eclipse 80i (vật kính 10x). **A.** Dưới ánh sáng huỳnh quang ( $\lambda = 450 - 490$  nm). **B.** Dưới ánh sáng huỳnh quang kết hợp ánh sáng trắng.

## KẾT LUẬN

Trong công trình này, chúng tôi đã nuôi cấy ổn định dòng tế bào CHO-S và sử dụng vector pEGFP-N2 mang cấu trúc biểu hiện gen *gfp* làm vật liệu chuyển gen. Hai phương pháp sử dụng lipofectamine 2000 và calcium phosphate đã được dùng để biến nạp pEGFP-N2 vào tế bào CHO-S. 48 giờ sau khi biến nạp, biểu hiện của GFP đã được kiểm tra trên kính hiển vi huỳnh quang. Các tế bào chuyển gen và biểu hiện ổn định GFP đã được chọn lọc và giữ dòng. Các kết quả nghiên cứu trên đã cho thấy tiềm năng ứng dụng của các kỹ thuật như nuôi tế bào động vật có vú, chuyển gen, biểu hiện tức thời protein và chọn dòng tế bào chuyển gen ổn định trong nghiên cứu biểu hiện gen tại Việt Nam. Đây là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo trong lĩnh vực tạo protein tái tổ hợp có giá trị sử dụng trong hệ biểu hiện tế bào động vật có vú nuôi cấy như CHO-S.

**Lời cảm ơn:** Chúng tôi xin chân thành cảm ơn GS. Reinhard Walther, Đại học Greifswald, CHLB Đức về việc cung cấp vector pEGFP-N2 làm vật liệu nghiên cứu. Công trình này được thực hiện tại Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, nhờ sự hỗ trợ kinh phí của các Đề tài cơ sở cấp Viện Công nghệ sinh học-mã số CNSH/KN. 07-08-03 và đề tài nhánh thuộc đề tài cấp nhà nước-mã số KC 10/06-10.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Lê Trần Bình, Cao Huyền Trang (2005) Nghiên cứu và phát triển sản xuất vaccine ăn được trong thực vật. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 3(2): 133-142.

Nguyễn Đình Cường, Lê Thị Thu Hiền, Nông Văn Hải, Đặng Thành Nam, Phan Văn Chi (2004) Tinh chế và phân tích khối phổ protein bất hoạt ribosome tái tổ hợp từ cây mướp đắng (*Momordica charantia* L.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 2(2): 217-226.

Nguyễn Đình Cường, Nguyễn Thùy Dương, Lê Thị Thu Hiền, Lương Thị Thu Hương, Trần Thị Phương Liên, Nguyễn Huy Hoàng, Phan Văn Chi, Nông Văn Hải (2003) Biểu hiện gen mã hóa protein bất hoạt ribosome của cây mướp đắng ở vi khuẩn *Escherichia coli*. *Tạp chí Công*

*nghệ Sinh học* 1(4): 451-460.

Nguyễn Thúy Hà, Nguyễn Bích Nhi, Đỗ Khắc Hiếu, Phan Văn Chi (2003) Khả năng ức chế các dòng tế bào ung thư nuôi cấy *in vitro* của Trichobakin tái tổ hợp. *Tạp chí Y học Việt Nam* 284(5): 26-30.

Đặng Trần Hoàng, Vũ Minh Đức, Phùng Thu Nguyệt, Trương Nam Hải (2005) Biểu hiện gen interleukin-2 của người rh-IL2MM bị đột biến tại các điểm glycosyl hóa và gốc cysteine 125 trong *Escherichia coli*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 3(2): 149-154.

Bùi Thị Huyền, Đặng Thành Nam, Nguyễn Nam Long, Nguyễn Bích Nhi, Hoàng Quốc Trường, Phan Văn Chi (2005) Biểu hiện và xác định interleukin-2 của người. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 3(2): 143-148.

Nguyễn Nam Long, Nguyễn Bích Nhi, Phan Văn Chi (2005) Tách dòng gen mã hóa interleukin-2 của người. *Tạp chí Y học Việt Nam* 310(5): 26-30.

Chu Kỳ Nam, Hoàng Văn Quốc Chương, Trần Linh Thuộc (2005) Tạo dòng và biểu hiện mini-proinsulin của người tái tổ hợp trong *Escherichia coli*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 3(2): 155-160.

Bhopale GM, Nanda RK (2005) Recombinant DNA expression products for human therapeutic use. *Curr Sci* 89(4): 614-622.

[http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2008/](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/).

Prasher D, Eckenrode V, Ward W, Prendergast F, Cormier M (1992) Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene* 111(2): 229-233.

Rosser MP, Xia W, Hartsell S, McCaman M, Zhu Y, Wang S, Harvey S, Bringmann P, Cobb RR (2005) Transient transfection of CHO-K1-S using serum-free medium in suspension: a rapid mammalian protein expression system. *Protein Expr Purif* 40(2): 237-243.

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3 rd ed.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Wurm FM (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* 22(11): 1393-1398.

Ye J, Kober V, Tellers M, Naji Z, Salmon P, Markusen JF (2009) High-level protein expression in scalable CHO transient transfection. *Biotechnol Bioeng* 103(3): 542-551.

## EXPRESSION OF THE GREEN FLUORESCENCE PROTEIN (GFP) IN THE CULTURED MAMMALIAN CELLS

Nguyen Hai Ha, Le Thi Thu Hien, Nong Van Hai

*Institute of Biotechnology*

### SUMMARY

Cultured mammalian cells have been extensively utilized as platform for recombinant protein production because of their post-translational modifications. Several rodent- or human derived cells like CHO, HBK and HEK are frequently used for complex protein expression. Despite the plenitude of cell lines, nearly 70% of all recombinant therapeutic proteins produced today are made in CHO cells. In order to establish a protein expression system in CHO cells, the gene encoding the green fluorescence protein, GFP, was selected as the target gene of this study. pEGFP-N2 vector containing the *gfp* gene was delivered into cells by calcium phosphate or lipofectamin 2000. Forty-eight hours after transfection, the GFP expression was checked by its fluorescent intensity under a fluorescent microscopy. The transfected cells are about 50 - 60% of the total cells. The stable transfected cell line named CHO/GFP expressing high level of the GFP was selected by geneticine antibiotic. These results showed the applicability of the modern cell cultured techniques for transient transfection and stable transfected cell line development to study the expression of therapeutic recombinant proteins in the CHO cell system.

**Keywords:** *Gen expression, GFP, mammalian cell culture, Chinese Hamster Ovary cell (CHO cell), expression vector*