

NGHIÊN CỨU CÁC HỆ THỐNG BIỂU HIỆN GEN TRONG *E. coli* ĐỂ SẢN XUẤT PROTEIN TÁI TỔ HỢP

Mã số đề tài: 643204

Chủ nhiệm đề tài: PGS.TS. TRẦN LINH THUỐC

Cơ quan công tác: Trường ĐH Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia TP.HCM

Địa chỉ liên lạc: 227 Nguyễn Văn Cừ, Q. 5, TP.HCM,

Điện thoại: 08-8307079 Email: tlthuoc@hcmuns.edu.vn,
tlthuoc@hcmc.netnam.vn

Thành viên tham gia:

- Nguyễn Đức Hoàng
- Phan Thị Phương Trang
- Hoàng Văn Quốc Chương
- Nguyễn Thanh Thùy Nhiên
- Nguyễn Quỳnh Anh
- Phạm Hồng Ánh
- Chu Kỳ Nam
- Nguyễn Văn Nhung

1. Tóm tắt mục đích, nội dung nghiên cứu

Đề tài nhằm so sánh các hệ thống biểu hiện gen khác nhau trong tế bào *E. coli* đã được thương mại hóa, đề xuất các quy tắc chọn lựa hệ thống để phù hợp với protein mục tiêu và các công đoạn lên men, sau lên men. Kết quả của đề tài tạo cơ sở cho việc phát triển nghiên cứu công nghệ sản xuất và tinh chế protein tái tổ hợp phục vụ chẩn đoán, điều trị và phòng ngừa bệnh trên người, vật nuôi, cây trồng.

2. Kết quả nghiên cứu, ý nghĩa khoa học đã đạt được

2.1. Kết quả nghiên cứu

1) Đã tạo thành công 03 dòng *E. coli* để biểu hiện gen mã hóa là protein vỏ VP28 của vi rút gây hội chứng đốm trắng trên tôm sú (WSSV) trong ba hệ thống biểu hiện khác nhau pET, pGEX, pQE; khảo sát mức độ biểu hiện trong các chủng chủ khác nhau; biểu hiện gen và chứng minh sự biểu hiện của gen và sự hiện diện của protein tái tổ hợp bằng SDS-PAGE, Western blot; định lượng và so sánh mức biểu hiện.

2) Khảo sát ảnh hưởng của 3 hệ vector (pET, pGEX, pQE), 5 chủng chủ *E. coli* (BL21, BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, M15[pREP4], SG13009[pREP4], nhiệt độ, thời gian và nồng độ chất cảm ứng lên hiệu suất biểu hiện của protein tái tổ hợp (VP28 của virút gây hội chứng đốm trắng WSSV) trong *E. coli*. Kết quả cho thấy:

- Chủng M15[pREP4] là thích hợp nhất cho việc biểu hiện protein tái tổ hợp bằng vector pQE30. Chủng SG13009[pREP4] cũng có thể được sử dụng nhưng hiệu quả biểu hiện thấp hơn.

- Chủng BL21 là thích hợp nhất cho việc biểu hiện protein tái tổ hợp bằng vector pGEX-2TK, tiếp theo là chủng BL21(DE3).

- Chủng BL21(DE3) là thích hợp nhất cho việc biểu hiện protein tái tổ hợp bằng vector pET43.1a, tiếp theo là chủng BL21(DE3)pLysS.

- Như vậy khi lập kế hoạch tạo dòng gen và tổng hợp protein tái tổ hợp trong *E. coli* bằng các hệ thống pQE, pGEX, pET nên ưu tiên sử dụng các chủng chủ tương ứng là M15[pREP4], BL21, BL21(DE3).

3) Khảo sát ảnh hưởng của các protein thioredoxin (Trx), glutathione-S-transferase (GST), protein gắn maltose (MBP) và NusA ở dạng đuôi dung hợp (tag) lên tính tan của protein tái tổ hợp được biểu hiện trong *E. coli*. Gen mã hóa cho protein không cấu trúc NS1 của virút viêm não Nhật Bản JEV (Japanese Encephalitis Virus) được chọn làm mô hình khảo sát. Gen mã hóa NS1 được tạo dòng vào các vector pTrx, pGST, pMBP và pNusA để NS1 được biểu hiện dưới dạng protein dung hợp (fused protein) với Trx (Trx-NS1), GST (GST-NS1), MBP (MBP-NS1) hoặc NusA (NusA-NS1). Hàm lượng các protein dung hợp ở pha tan và không tan sau khi đồng nhất tế bào được định lượng bằng SDS-PAGE và phần mềm Quantity One (BioRad). Kết quả cho thấy trong các protein dung hợp được tạo thành thì MBP-NS1 có khả năng tan cao nhất (44,47% trong tổng MBP-NS1 trong pha tan và không tan), tiếp theo là NusA-NS1 (20,03%) và GST-NS1 (13,05%). Trx-NS1 hầu như không tan.

4) Đã tạo dòng và biểu hiện mini-proinsulin tái tổ hợp trong *E. coli* và khảo sát điều kiện lên men tổng hợp mini-proinsulin tái tổ hợp ở qui mô pilot. Kết quả cho thấy đã xác định được điều kiện lên men thích hợp và có thể sử dụng môi trường chứa glucose 0,5%, cao nấm men 0,5% và NaCl 0,5% làm môi trường để lên men pilot thay cho môi trường LB đặc tiện (trypton 1%, cao nấm men 0,5%, NaCl 0,5%), sử dụng lactose để cảm ứng sự biểu hiện của gen thay cho chất cảm ứng tổng hợp đặc tiện IPTG để lên men tổng hợp mini-proinsulin tái tổ hợp ở qui mô 30 lít. Hiệu suất biểu hiện là 6,1% thấp hơn ở qui mô phòng thí nghiệm (11,7%). Tuy nhiên hiệu suất biểu hiện này có thể được tiếp tục cải thiện bằng phương pháp tối ưu hóa điều kiện lên men sau này.

5) Ngoài ra, đề tài còn thực hiện thành công việc tạo dòng và biểu hiện một gen mã hóa kháng nguyên khác VP281, VP19 của WSSV trong *E. coli*.

2.2. Ý nghĩa khoa học.

Kết quả của đề tài có các đóng góp khoa học sau đây:

- So sánh các hệ thống biểu hiện gen khác nhau trong tế bào *E. coli* đã được thương mại hóa, tạo cơ sở khoa học cho việc đề xuất các quy tắc chọn lựa hệ thống biểu hiện thích hợp để sản xuất protein tái tổ hợp.

- So sánh và đề xuất việc chọn lọc các đuôi dung hợp (tag) để cải thiện tính tan của protein tái tổ hợp trong *E. coli*.

- Bước đầu xác định các điều kiện cho phép lên men *E. coli* ở qui mô pilot để sản xuất protein tái tổ hợp với chi phí thấp.

- Tạo các kháng nguyên tái tổ hợp khác nhau của WSSV làm cơ sở cho việc chọn lọc kháng nguyên hữu hiệu dùng trong chẩn đoán WSSV bằng phương pháp miễn dịch.

- Tạo cơ sở bước đầu để xây dựng công nghệ sản xuất insulin tái tổ hợp tại VN

3. Ý nghĩa thực tiễn và hiệu quả ứng dụng thực tiễn

- Các protein vỏ VP28, VP281, VP19, tái tổ hợp tạo thành là nguyên liệu kháng nguyên để phát triển kháng thể trong các xét nghiệm nhanh bệnh đốm trắng trên tôm sú bằng phương pháp miễn dịch (ELISA...)

- Insulin tái tổ hợp là thuốc đặc trị để điều trị bệnh tiểu đường typ 1 ở nước ta hiện đang phải nhập khẩu. Việc sản xuất thành công insulin tái tổ hợp bằng công nghệ gen góp phần tạo ra thuốc đặc trị cần thiết và thay thế thuốc ngoại nhập.

4. Kết quả đào tạo sau đại học

Thạc sĩ: 05; số đã bảo vệ: 02; số đang hướng dẫn: 03
Tiến sĩ: 01; số đã bảo vệ: 0; số đang hướng dẫn: 01

5. Các sản phẩm khoa học đã hoàn thành

5.1 Các công trình đã công bố trên các tạp chí khoa học

- [1]. Tạo dòng và biểu hiện gen mã hóa protein vỏ VP28 của virus gây hội chứng đốm trắng WSSV trên tôm sú trong *E. coli*, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 1, 47-56, 2003.
- [2]. Tạo dòng và biểu hiện gen mã hóa protein vỏ VP19 của vi rút WSSV gây hội chứng đốm trắng trên tôm sú trong *E. coli*, *Tạp chí Di truyền và ứng dụng*, 4, 49-55, 2003.
- [3]. Sử dụng vector pQE để biểu hiện và tinh chế protein vỏ VP28 của virus gây hội chứng đốm trắng trên tôm sú, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 1, 299-307, 2003.
- [4]. Tạo dòng và biểu hiện gen mã hóa protein vỏ VP281 của virus gây hội chứng đốm trắng White Spot Syndrome Virus) trên tôm sú (*Penaeus monodon*), *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2, 49-56, 2004.
- [5]. Tạo dòng và biểu hiện mini-proinsulin tái tổ hợp trong *E. coli*, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2, 155-160, 2005.

5.2. Các báo cáo khoa học tại các hội nghị, hội thảo khoa học

- [1]. Nghiên cứu thành phần môi trường và điều kiện nuôi cấy để tổng hợp mini-proinsulin tái tổ hợp trong *E. coli* ở qui mô pilot, Báo cáo Khoa học Hội nghị toàn quốc Nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống, Trường ĐH Y Hà Nội, 1157-1159, 11/2005.
- [2]. Ảnh hưởng của vector và chủng chủ lên sự biểu hiện protein tái tổ hợp trong *E. coli*: trường hợp protein VP28 của virus gây hội chứng đốm trắng WSSV, Hội nghị toàn quốc Nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống, Trường ĐH Y Hà Nội, 1325-1328, 2005, 11/2005.
- [3]. Ảnh hưởng của các protein "tag" lên tính tan của các protein dung hợp tái tổ hợp: trường hợp protein NS1 của virus viêm não Nhật Bản, Hội nghị toàn quốc Nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống, Trường ĐH Y Hà Nội, 1343-1346, 2005, 11/2005.

6. Đánh giá và kiến nghị

Đề tài được tiến hành đúng nội dung đăng ký, có kết quả tốt, có 05 bài báo khoa học ở tạp chí trong nước, 03 báo cáo tại hội nghị khoa học toàn quốc, đào tạo 02 thạc sĩ đã bảo vệ thành công và 01 nghiên cứu sinh. Đề tài tạo một số cơ sở khoa học và thực tiễn cần cho việc ứng dụng công nghệ gen để sản xuất protein tái tổ hợp ở Việt Nam, đặc biệt là các kháng nguyên tái tổ hợp để chẩn đoán virus gây bệnh đốm trắng trên tôm sú và insulin tái tổ hợp dùng để điều trị bệnh tiểu đường.

STUDY ON GENE EXPRESSION SYSTEMS IN *E. coli* FOR THE PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEIN

ABSTRACT

The research is to compare different commercially available expression systems in *E. coli* and to suggest categories for the selection of a system which is most suitable for a targeted protein as well for fermentation and downstream step. Results of this research provide the base for the process development in production and purification of recombinant protein for diagnosis, treatment and prevention of disease in human being, animals and plants.