

Tạo dòng, biểu hiện và thu nhận nhân tố tăng trưởng tế bào sừng KGF (Keratinocyte Growth Factor) tái tổ hợp dạng tiết ở nấm men *Pichia pastoris*

Nguyễn Phạm Anh Thư¹, Nguyễn Thị Thùy Trang¹, Nguyễn Hiếu Nghĩa¹, Đặng Thị Phương Thảo^{1,2,*}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

TÓM TẮT

Nhân tố tăng trưởng tế bào sừng (KGF - Keratinocyte Growth Factor) là nhân tố tăng trưởng hoạt động theo cơ chế cận tiết, do tế bào trung mô tiết ra, có vai trò kích thích sự tăng sinh, biệt hóa và di chuyển của tế bào biểu mô đồng thời hỗ trợ tái tạo biểu mô tổn thương. Trong các nghiên cứu gần đây, KGF tái tổ hợp được sản xuất từ nhiều hệ thống biểu hiện như vi khuẩn, tế bào thực vật, tế bào côn trùng, tế bào động vật có vú nhưng mức độ biểu hiện thấp, chi phí cao và khó khăn trong quy trình thu nhận. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng nấm men *Pichia pastoris* làm tế bào chủ để biểu hiện protein KGF dạng tiết dưới sự điều hoà của promoter AOX1 với cảm ứng methanol. Kết quả cho thấy dòng nấm men *Pichia pastoris* X33:kgf có khả năng biểu hiện KGF tái tổ hợp dạng tiết trong môi trường BMMY cảm ứng bằng 0,5% methanol. Protein tiết được thu nhận và tinh chế bằng sắc ký ái lực heparin, đạt được 1,350 mg/l với độ tinh sạch 99,89%. Bên cạnh đó, KGF tái tổ hợp cho thấy khả năng kích thích tăng sinh trên dòng tế bào A549 là tế bào có thụ thể dành cho KGF tự nhiên.

Từ khoá: heparin, KGF, nhân tố tăng trưởng, *Pichia pastoris*

GIỚI THIỆU

KGF hay FGF7, là nhân tố tăng trưởng được sinh tổng hợp bởi các tế bào có nguồn gốc trung mô, được phát hiện và phân lập lần đầu tiên vào năm 1989 bởi Rubin và cộng sự từ dòng tế bào nguyên bào sợi phổi M426 trong phôi thai người [1, 2]. Các nghiên cứu cho thấy rằng KGF có nhiều chức năng khác nhau bao gồm kích thích phân chia, tăng sinh và biệt hóa các dòng tế bào biểu mô và tế bào sừng [1, 3, 4]. Bên cạnh đó, KGF còn có vai trò trong việc tái tạo, sửa chữa các mô và cơ quan tổn thương thông kích thích sự di chuyển của các tế bào sừng và biểu mô ở miệng vết thương, từ đó thúc đẩy tiến trình lành vết thương [5, 6]. Hiện nay, KGF đã được nghiên cứu rộng rãi và ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như mỹ phẩm, dược phẩm và hỗ trợ trong điều trị ung thư [7-9].

Việc hóa trị và xạ trị thời gian dài trong điều trị ung thư có thể gây ra nhiều tác dụng phụ đối với cơ thể bệnh nhân mà phổ biến nhất là giảm sức đề kháng, dẫn đến người bệnh phải đối mặt thêm với các hội chứng khác như loét miệng, nhiễm trùng hay rụng tóc [10]. Để giải quyết tình trạng trên, thị trường xuất hiện nhiều sản phẩm hướng đến hỗ trợ bệnh nhân trong điều trị ung thư, trong đó có nhiều sản phẩm có bản chất sinh học. Palifermin (Kepivance™) là sản phẩm KGF tái tổ hợp sản xuất trên hệ thống *E. coli* đã

được FDA Hoa Kỳ phê chuẩn vào ngày 15/12/2004, chấp thuận cho thương mại và sử dụng để làm giảm hội chứng viêm loét miệng nhầy niêm mạc miệng ở các bệnh nhân ung thư máu ác tính trải qua nhiều trị liệu hóa trị và xạ trị.

Với tiềm năng ứng dụng lớn trong nhiều lĩnh vực, tuy nhiên việc sử dụng KGF vẫn còn hạn chế vì giá thành cao do lượng KGF thu nhận tự nhiên tương đối thấp. Theo thống kê, trung bình một bệnh nhân có trọng lượng 70 kg sẽ tốn khoảng 5000 euro cho một lần điều trị bằng Palifermin [11], tương đương khoảng hơn 100 triệu VNĐ. Với mục tiêu thu nhận KGF với lượng lớn hơn, có nhiều chiến lược biểu hiện tái tổ hợp đã và đang được tiến hành trên nhiều hệ thống như vi khuẩn *E.coli* [12, 13], tế bào cây thuốc lá [6], tế bào con tằm [14], tế bào chuột lang Trung Quốc - CHO [15], tuy nhiên vẫn còn tồn tại nhiều nhược điểm như lượng KGF thu nhận thấp, bản thân KGF gây độc cho tế bào chủ biểu hiện như ở hệ thống *E. coli* [12]; đồng thời, hiệu quả sản xuất thấp do chi phí cao ở hệ thống biểu hiện tế bào động vật có vú,... Năm 2018, Bahadori và cộng sự đã biểu hiện thành công KGF dạng tiết ở hệ thống tế bào nấm men *P. pastoris* với hoạt tính kích thích tăng sinh trên dòng tế bào A549 và NIH3T3. Nhận thấy *P. pastoris* là hệ thống tế bào chủ biểu hiện với nhiều ưu điểm như

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

²Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Phân tử, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

Liên hệ

Đặng Thị Phương Thảo, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Phân tử, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

Email: thaodp@hcmus.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 01-4-2020
- Ngày chấp nhận: 18-5-2020
- Ngày đăng: 01-7-2020

DOI: 10.32508/stdjns.v4i3.900



Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Trích dẫn bài báo này: Thư N P A, Trang N T T, Nghĩa N H, Thảo D T P. Tạo dòng, biểu hiện và thu nhận nhân tố tăng trưởng tế bào sừng KGF (Keratinocyte Growth Factor) tái tổ hợp dạng tiết ở nấm men *Pichia pastoris*. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 4(3):573-583.

khả năng biến đổi sau dịch mã và gấp cuộn protein tương đồng với tế bào động vật, đặc biệt promoter mạnh và khả năng tiết protein ngoại bào giúp protein tái tổ hợp ở hệ thống này biểu hiện ở mức độ cao, có thể chiếm tới hơn 80% tổng protein tiết [16–18], chúng tôi lựa chọn *P. pastoris* nhằm biểu hiện KGF tái tổ hợp. Với chiến lược trên, gen mã hóa cho protein KGF được dòng hóa vào vector pPICZ α A sau đó gắn chèn vào DNA bộ gen của nấm men *P. pastoris* X33 nhờ cơ chế tái tổ hợp tương đồng. Dưới sự kiểm soát của promoter AOX1- cảm ứng bởi methanol, protein KGF dạng tiết được biểu hiện, thu nhận và tinh sạch bằng sắc ký ái lực heparin, sau đó, đánh giá hoạt tính sinh học dựa trên khả năng kích thích tăng sinh tế bào A549. Kết quả của đề tài hướng tới giảm giá thành của các sản phẩm thương mại hiện tại và góp phần hỗ trợ các bệnh nhân trong việc điều trị ung thư cũng như mở rộng ứng dụng trong các lĩnh vực khác như mỹ phẩm hay các sản phẩm chăm sóc sức khỏe.

VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

Chủng, plasmid và tế bào

Chủng *E. coli* DH5 α [F⁻ ϕ 80 *lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1* *endA1* *hsdR17* (*rK*⁻, *mK*⁺) *phoA* *supE44* λ ⁻ *thi-1* *gyrA96* *relA1*] dùng để cấu trúc vector tái tổ hợp, được nuôi cấy trong môi trường LB (Trypton 1%, cao nấm men 0,5%, NaCl 0,5%).

Chủng nấm men *P. pastoris* X33 [Hoang đại, Mut⁺] dùng để biểu hiện KGF, được nuôi cấy trong môi trường YPD (Dextrose 2%, peptone 2%, cao nấm men 1%).

Plasmid pPICZ α A (V195-20, Invitrogen) có kích thước 3593bp được dùng làm vector dòng hóa gen *kgf*, mang gen kháng zeocin hỗ trợ quá trình sàng lọc dòng tái tổ hợp, promoter AOX cảm ứng bởi methanol, trình tự tín hiệu tiết α -MF giúp hỗ trợ tiết protein ngoại bào.

Gen mã hóa cho protein KGF (gen *kgf*) được tham khảo từ Genbank [Genbank: M60828.1], thiết kế lại dựa trên trình tự protein KGF từ ngân hàng dữ liệu protein Drugbank [Drugbank: Palifermin DB00039] và tối ưu hóa nhằm phù hợp với bộ mã di truyền của chủng chủ biểu hiện *P. p. pastoris*.

Dòng tế bào A549 (ATCC: CCL-1859) có thụ thể KGF được sử dụng để thử hoạt tính sinh học của protein KGF.

Cấu trúc vector tái tổ hợp pPICZ α A-*kgf*

Sau khi được tổng hợp hóa học từ trình tự đã thiết kế, gen *kgf* được khuếch đại bằng phương pháp PCR bằng cặp mồi đặc hiệu KGF-F/R với trình tự lần lượt là AAG GGG TAT CTC TCG AGA AAA GAT CTT

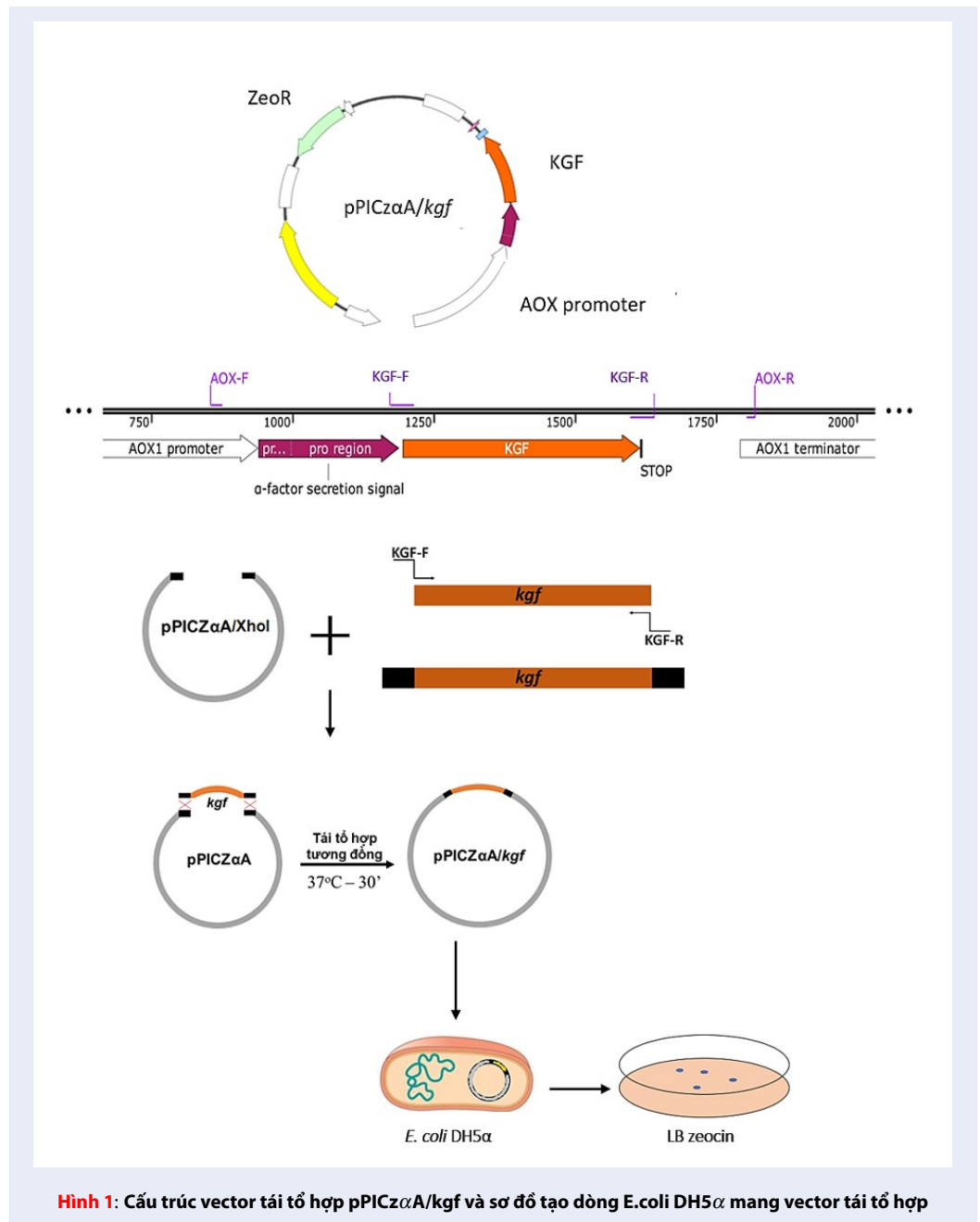
ACG ATT ACA TGG AAGG và GCG GCC GCC GCG GCT CGA GTC ATT AAG TAA TAG CCA TTG GCAA. Chu kỳ PCR được thiết lập như sau: Biến tính 94°C 3 phút, lặp lại 30 lần chu kỳ 94°C 30 giây, 55°C 30 giây, 72°C 30 giây, kéo dài 72°C 5 phút, ổn định 32°C 3 phút. Vector pPICZ α A được tách chiết bằng phương pháp SDS-kiềm và được cắt mở vòng bằng enzyme *XhoI*. Sản phẩm PCR và sản phẩm cắt được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,2%.

Gen *kgf* được tinh sạch bằng phương pháp tủa cồn, plasmid sau khi cắt được tinh sạch qua cột silica gel bằng bộ kit EZ-10 (Biobasic), sau đó gen *kgf* được dòng hóa vào plasmid pPICZ α A theo cơ chế tái tổ hợp tương đồng bằng bộ kit eClone được cung cấp bởi bộ môn Công nghệ Sinh học Phân tử và Môi trường – trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP. HCM. Cấu trúc vector tái tổ hợp và sơ đồ tạo dòng được thể hiện ở Hình 1. Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α bằng phương pháp hóa biến nạp và sàng lọc trên môi trường LB agar với kháng sinh zeocin (nồng độ 50 μ g/ml). Các thể biến nạp được sàng lọc bước đầu bằng phản ứng PCR khuếch đại bằng mồi đặc hiệu, các khuẩn lạc cho kết quả dương tính được tiến hành tách chiết plasmid bằng phương pháp SDS – kiềm. Các plasmid sau khi tách chiết được sử dụng làm mạch khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi KGF-F và AOX-R để xác nhận gen đã chèn vào plasmid pPICZ α A đúng khung đọc mở như thiết kế. Cuối cùng, vector tái tổ hợp được giải trình tự bằng cặp mồi AOX-F và AOX-R.

Tạo dòng nấm men *P. pastoris* X33 mang vector tái tổ hợp pPICZ α A-*kgf*

Để cấu trúc chủng nấm men *P. pastoris*::*kgf*, các plasmid tái tổ hợp mang gen *kgf* được cắt mở vòng với enzyme *SacI* tại vị trí vùng promoter AOX1 nhằm tăng khả năng sát nhập vào bộ gen của nấm men, sau đó được đưa vào tế bào chủ *P. pastoris* bằng phương pháp điện biến nạp với điện dung 25 μ F, điện trở 200 Ω , hiệu điện thế 1,5 kV trong 5,0 ms.

Nhằm phát hiện sự hiện diện của gen trong các thể biến nạp, các khuẩn lạc mọc được trên đĩa YPD với kháng sinh zeocin với nồng độ 100 μ g/ml được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR khuếch đại sàng lọc với mồi đặc hiệu KGF-F và KGF-R. Các khuẩn lạc nấm men được phá lớp vách dày chứa chitin và đường mannose bằng lyticase trước khi sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR. Các khuẩn lạc cho kết quả PCR dương tính được tách chiết DNA bộ gen và kiểm tra kiểu hình bằng phản ứng PCR với cặp mồi AOX-F/R.



Kiểm tra biểu hiện KGF dạng tiết của chủng P. pastoris X33::kgf

Các dòng *P. pastoris* X33::kgf tái tổ hợp mang kiểu hình Mut+ được tiến hành hoạt hóa trong môi trường BMGY (cao nấm men 1%, peptone 2%, YNB 1,34%, phosphate buffer 0.1M pH 6,0; biotin 4×10^{-5} %, glycerol 1%), nuôi cấy lắc trong 16 – 18 giờ ở nhiệt độ 30°C, tốc độ 250 vòng/phút sau đó được cấy chuyển sang môi trường BMMY (cao nấm men 1%, peptone 2%, YNB 1,34%, 10% phosphate buffer 1 M pH 6,0;

biotin 4×10^{-5} %, methanol 0,5%) với mật độ tế bào khởi điểm $OD_{600} = 1$ và bổ sung methanol với nồng độ cuối 0,5% sau mỗi 24 giờ nuôi cấy. Mật độ tế bào được xác định sau lần lượt 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ nhằm kiểm soát quá trình tăng trưởng của dòng nấm men tái tổ hợp, bên cạnh đó, mức độ biểu hiện của protein KGF trong dịch biểu hiện cũng được đánh giá bằng phương pháp di SDS-PAGE và khẳng định lại bằng phương pháp lai western với kháng thể đặc hiệu kháng KGF. Cụ thể, mẫu protein được phân tách trên

gelpolyacrylamide và được chuyển thấm lên màng nitrocellulose, khóa màng trong sữa gầy 5% qua đêm, sau đó tiến hành lai với kháng thể sơ cấp kháng KGF (R&D Systems) nồng độ 1 μ g/ml và kháng thể thứ cấp mouse – IgG gắn Horseradish peroxidase (HRP) (R&D Systems) tỉ lệ 1/1000. Tín hiệu được ghi nhận trên màng lai nhờ phản ứng giữa cơ chất peroxidase (H₂O₂) và luminol với HRP.

Tinh chế thu nhận protein KGF tái tổ hợp bằng sắc ký ái lực Heparin

Cột sắc ký ái lực Heparin 5ml (GE Healthcare Life Sciences) được cân bằng với 50 ml dung dịch A (20mM Tris – HCl, pH 7,5), 200 ml dịch biểu hiện sau khi thu nhận sẽ được lọc qua màng lọc 0,2 μ m sau đó tiến hành nạp qua cột. Sau khi toàn bộ mẫu đã được nạp, tiến hành rửa cột với 50ml 100% dung dịch A và 50 ml dung dịch 30% B (20mM Tris – HCl, pH 7,5, 2M NaCl) nhằm loại bỏ một phần protein tạp bám không đặc hiệu trên cột, sau đó protein mục tiêu KGF được dung ly khỏi cột với 50% và 100% dung dịch B. Tốc độ cho toàn quy trình là 5ml/phút. Các phân đoạn sau tinh chế được tiến hành điện di SDS PAGE, đánh giá độ tinh sạch bằng phần mềm Gel analyzer và định lượng nồng độ protein mục tiêu bằng phương pháp Bradford.

Thử nghiệm hoạt tính sinh học của protein KGF tái tổ hợp bằng phương pháp MTT

Thử nghiệm MTT được dùng để đánh giá hoạt tính kích thích tăng sinh của KGF tái tổ hợp trên tế bào A549. Tế bào A549 được nuôi cấy 3 ngày trong đĩa Φ 60, thu nhận và chuyển vào vào đĩa 96 giếng với mật độ 10⁴ tế bào/giếng trong môi trường nuôi cấy DMEM/F12 có bổ sung 10% FBS, 100 μ l/ giếng. Ủ tế bào ở 37°C, 5% CO₂ trong 24 giờ. Loại môi trường cũ, rửa tế bào bằng môi trường DMEM/F12 không chứa FBS, bổ sung 95 μ l DMEM/F12 không chứa FBS. Bổ sung 5 μ l KGF ở các nồng độ 25; 50; 100; 200 ng/ μ l vào mỗi giếng và 5 μ l dung dịch pha loãng mẫu vào chúng âm. Ủ tế bào ở 37°C, 5% CO₂ trong 48 giờ. Bổ sung 5 μ l MTT (5mg/ml) vào mỗi giếng. Ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 3 giờ. Hút bỏ toàn bộ dịch nổi, bổ sung 100 μ l dung dịch hoà tan MTT vào mỗi giếng. Đặt đĩa lên máy lắc trong 10 phút. Đo lượng tinh thể tím được tạo thành bằng máy đọc đĩa 96 giếng ở bước sóng 550 nm. Thực hiện tương tự với mẫu KGF thương mại. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần và đánh giá thống kê bằng T-test.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tối ưu hóa trình tự gen mã hóa cho phân đoạn protein KGF

Trình tự gen *kfg* được dịch mã ngược từ trình tự polypeptide của KGF thu từ ngân hàng dữ liệu Drugbank. Đây là trình tự protein KGF được biểu hiện và thu nhận ở hệ thống *E.coli* và được sử dụng làm thuốc. Vì vậy với mục tiêu biểu hiện protein KGF với cùng trình tự polypeptide ở hệ thống *Pichia pastoris*, chúng tôi tiến hành tối ưu một số bộ ba mã hóa của gene *kfg*. Gen mục tiêu được tối ưu bằng phần mềm snapgene và kiểm tra trình tự bằng phần mềm Genscript. Kết quả phân tích trình tự ở Bảng 1 cho thấy, trước khi được tối ưu, gen *kfg* có chỉ số tương thích codon (CAI) trên hệ thống *Pichia pastoris* đạt 0,8 – là chỉ số thấp nhất trong khoảng lý tưởng (0,8 – 1,0). Sau khi được tối ưu, chỉ số tương thích đạt 0,92, bên cạnh đó tần suất sử dụng codon hiếm cũng giảm từ 7% xuống 0% - là chỉ số lý tưởng cho việc biểu hiện protein ngoại lai. Đặc biệt, sau khi đã tối ưu, tỉ lệ GC trong phân tử thay đổi không đáng kể (tăng 1,35%) và vẫn nằm trong khoảng lý tưởng.

Cấu trúc vector tái tổ hợp pPICZ α -A-*kfg*

Các khuẩn lạc cho kết quả PCR dương tính với vạch DNA có kích thước tương ứng với kích thước chứng dương gen *kfg* (468 bp) trên bản điện di được tách plasmid tái tổ hợp bằng phương pháp SDS-kiểm và kiểm tra sự gắn chèn của gen *kfg* lên plasmid pPICZ α A bằng phản ứng PCR với cặp mồi KGF-F và AOX-R.

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR với khuôn mẫu là plasmid thu nhận từ các khuẩn lạc dương tính ở các giếng 3, 4, 5, 6 (Hình 2) cho thấy có 3 giếng xuất hiện vạch mục tiêu nằm giữa vạch 600 bp và 800 bp của thang DNA (giếng 3, 4, 6) chứng tỏ các plasmid tái tổ hợp ở các thể biến nạp này có gen *kfg* chèn đúng vị trí mong muốn như thiết kế. Ngược lại, ở giếng 2, sản phẩm PCR với khuôn là plasmid pPICZ α A nên không có vị trí bám đặc hiệu cho mồi KGF-F, do đó sản phẩm không xuất hiện vạch. Thêm vào đó, kết quả giải trình tự cho thấy gen *kfg* dòng hóa tương đồng 100% về mặt trình tự so với thiết kế ban đầu và đồng khung dịch mã với trình tự α -MF. Như vậy, nghiên cứu này đã cấu trúc thành công dòng tế bào *E. coli* DH5 α mang plasmid tái tổ hợp chứa gen mã hóa cho protein KGF.

Tạo dòng nấm men *P. pastoris* X33 mang gen mã hóa protein KGF

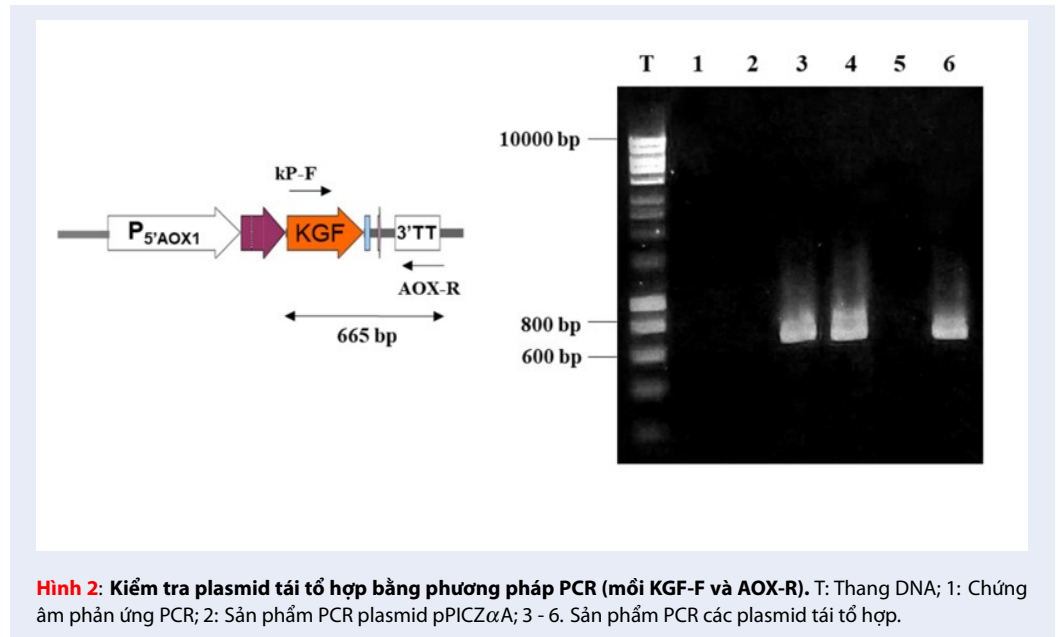
Gen AOX1 chịu trách nhiệm chính cho cơ chế sử dụng methanol ở nấm men *P. pastoris*, vì vậy sự sát nhập plasmid tái tổ hợp vào vùng gen này có thể xảy

Bảng 1: Kết quả tối ưu hóa codon của trình tự gen *kgf*

	Trước khi tối ưu	Sau khi tối ưu	Thông số lý tưởng
CAI (*)	0,8	0,92	0,8-1,0
CFD (%) (**)	7	0	<30%
Tỉ lệ GC (%)	34,39	35,74	30-70

*CAI (codon adaption index): Chỉ số tương thích codon

**CFD (codon usage frequency determination): Tần suất sử dụng codon hiếm.



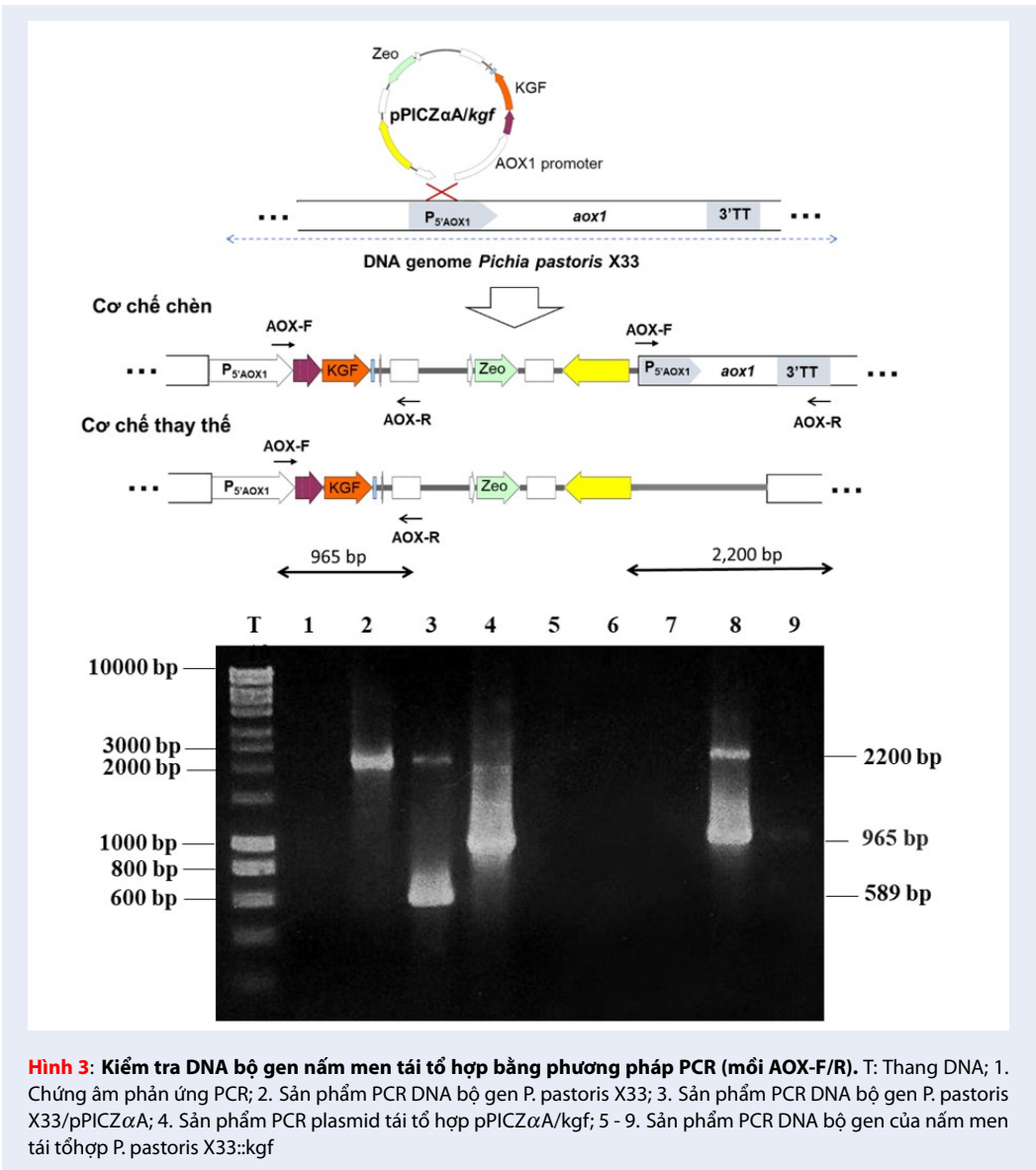
Hình 2: Kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng phương pháp PCR (mồi KGF-F và AOX-R). T: Thang DNA; 1: Chứng âm phản ứng PCR; 2: Sản phẩm PCR plasmid pPICZαA; 3 - 6. Sản phẩm PCR các plasmid tái tổ hợp.

ra hai trường hợp: tái tổ hợp theo cơ chế chèn gen vẫn giữ nguyên vùng gen *AOX1* nội sinh của nấm men, giúp chúng có khả năng sinh trưởng tốt trên môi trường có methanol (chúng mang kiểu hình Mut⁺) hoặc tái tổ hợp theo cơ chế thay thế, loại bỏ hoàn toàn vùng gen *AOX1* nội sinh của nấm men, khiến chúng sinh trưởng yếu hơn trên môi trường có methanol (chúng mang kiểu hình Mut^S). Kiểu hình của chủng nấm men tái tổ hợp được kiểm tra bằng phương pháp PCR với cặp mồi *AOX1* F/R. Kết quả phân tích sản phẩm PCR (Hình 3) cho thấy trong số 4 thể biến nạp tiến hành kiểm tra DNA bộ gen (giếng 5, 6, 7, 8), thể biến nạp ở giếng 8 có xuất hiện 2 vạch mục tiêu theo dự đoán là vạch gen *AOX1* nội sinh của nấm men với kích thước 2,2 kb và vạch gen *AOX1* có chèn gen mục tiêu *kgf* nằm trên plasmid pPICZαA với kích thước 965 bp. Chủng nấm men tái tổ hợp này mang kiểu hình Mut⁺ và được dự đoán có khả năng sinh trưởng tốt trên môi trường có methanol. Trường hợp chủng nấm men chỉ mang vector pPICZαA không chèn gen (Giếng 3), kết quả PCR với cặp mồi *AOX* sẽ cho vạch nội sinh trên bộ gen nấm men với kích thước 2,2 kb và

đoạn khuếch đại nằm trong vùng gen *AOX* của vector với kích thước 589 bp.

Kiểm tra khả năng biểu hiện KGF dạng tiết của chủng nấm men *P. pastoris* X33::*kgf*

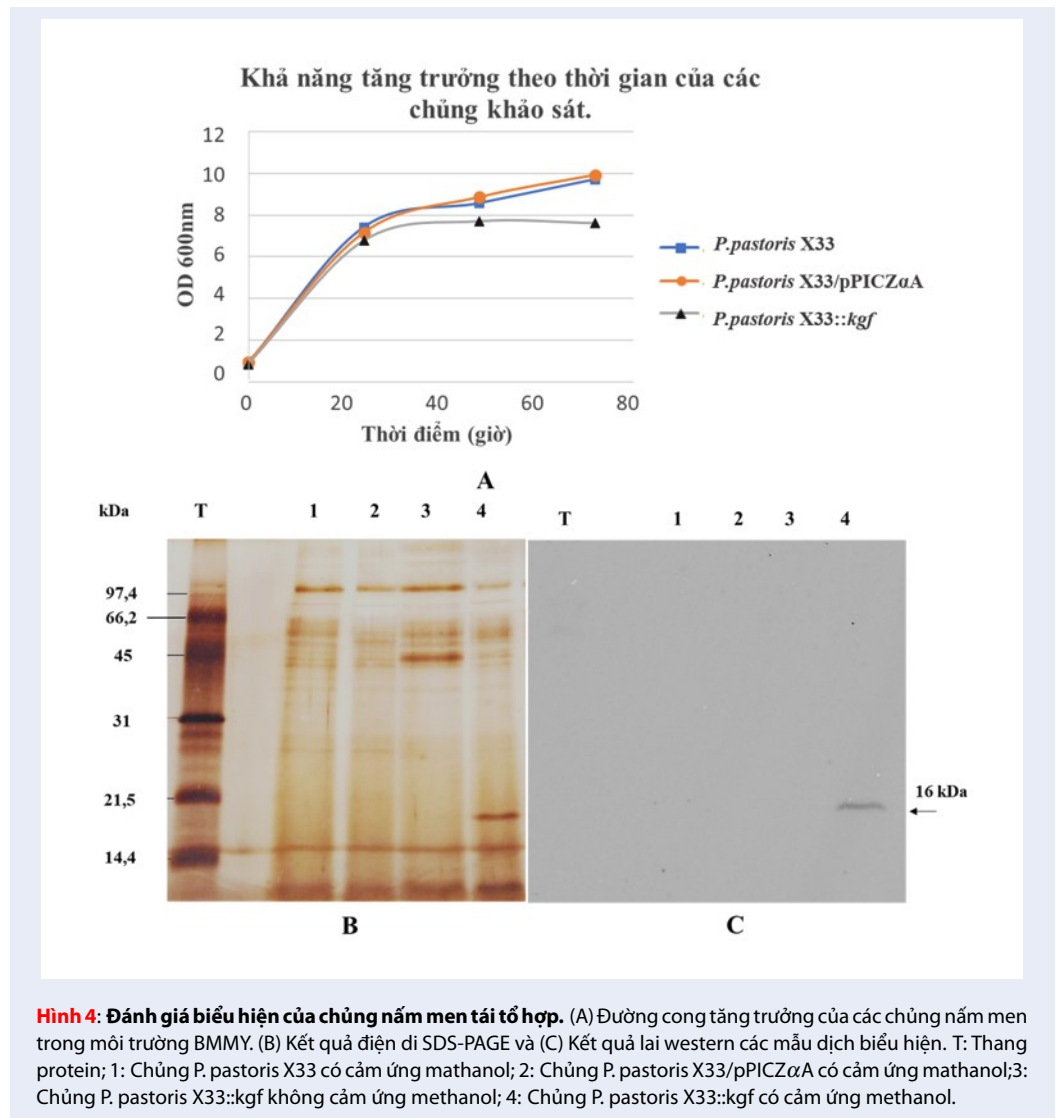
Chủng nấm men tái tổ hợp *P. pastoris* X33::*kgf* có kiểu hình Mut⁺ được tiến hành nuôi cấy và cảm ứng biểu hiện bằng methanol nồng độ cuối 0,5%, tiến hành biểu hiện đồng thời với chủng *P. pastoris* X33 và *P. pastoris* X33/pPICZαA làm đối chứng. Kết quả kiểm tra khả năng tăng trưởng trong môi trường BMMY với methanol là nguồn carbon duy nhất (Hình 4 A) cho thấy chủng tái tổ hợp *P. pastoris* X33::*kgf* có khả năng sử dụng methanol để tăng sinh khối, tuy nhiên tốc độ tăng trưởng của chủng nấm men tái tổ hợp thấp hơn so với 2 chủng đối chứng là *P. pastoris* X33 và *P. pastoris* X33::pPICZαA. Kết quả điện di SDS-PAGE mẫu dịch biểu hiện từ *P. pastoris* X33::*kgf* cho thấy ngoài vạch nội sinh của chủng *P. pastoris*, có xuất hiện một vạch kích thước khoảng 16 kDa, dự đoán đây là vạch protein KGF mục



tiêu (Hình 4 B, giếng 4). Nhằm khẳng định protein biểu hiện chính là KGF, tiến hành lai Western với kháng thể đặc hiệu kháng KGF. Kết quả cho thấy trên màng lai xuất hiện vạch tín hiệu tương ứng với vạch protein có kích thước 16 kDa trên bảng điện di SDS-PAGE mẫu dịch biểu hiện của chủng *P. pastoris* X33::kgf được cảm ứng bởi methanol (Hình 4 C, giếng 4). Các giếng còn lại không xuất hiện vạch tín hiệu này. Bên cạnh đó, ngoài vạch protein có kích thước 16 kDa như dự đoán thì không xuất hiện vạch kích thước nào khác. Điều này chứng tỏ protein biểu hiện dạng tiết thu được ở dịch môi trường chính là protein KGF mục tiêu và chúng tôi đã cấu trúc thành công chủng *P. pastoris* X33::kgf có khả năng biểu hiện protein KGF dạng tiết.

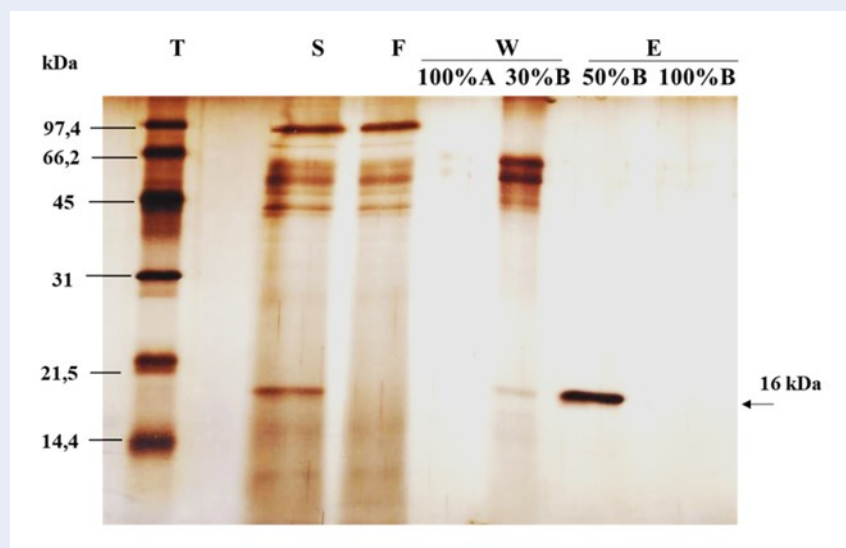
Tinh chế và thu nhận protein KGF tái tổ hợp bằng sắc ký ái lực Heparin

50ml dịch môi trường sau biểu hiện được cho qua cột heparin 5ml với tốc độ ổn định toàn bộ quy trình là 5 ml/phút, sau đó tiến hành rửa loại tạp bằng 100%A và 30%B (Phân đoạn W - wash), cuối cùng rotein KGF được dung ly ở phân đoạn 50%B và 100% B với thể tích 15ml (Phân đoạn E - elution). Kết quả điện di SDS-PAGE và định lượng nồng độ protein bằng phương pháp Bradford cho thấy từ 50ml dịch biểu hiện, với quy trình tinh chế trên đã thu được 67 μg KGF có độ tinh sạch 99,89%, phân tích bằng phần mềm gel analyzer (Hình 5, giếng E 50%B), (Bảng 2).



Bảng 2: Tổng hợp kết quả tinh chế KGF bằng sắc ký ái lực Heparin

Phân đoạn tinh chế	Thể tích (ml)	Nồng độ (μ g/ml)	Độ tinh sạch (%)	KGF thu nhận (μ g)
		Tổng		KGF
Mẫu biểu hiện (S)	50	116,71	15,82	791
Dung ly (E)	15	4,51	99,89	67,5



Hình 5: Đánh giá kết quả tinh chế KGF tái tổ hợp bằng phương pháp SDS-PAGE. T: thang protein (GE-Healthcare); S: Mẫu dịch biểu hiện; F: Phân đoạn qua cột; W: Phân đoạn rửa cột; E: Phân đoạn dung ly

Hiệu suất thu hồi ở nghiên cứu này thấp hơn so với nghiên cứu tương tự trên thế giới, cụ thể là nghiên cứu của Bahadori và cộng sự năm 2018 (1,3mg < 3mg) [19]. Sự khác biệt trên có thể nằm ở quy trình biểu hiện thu nhận protein KGF từ nấm men *P. pastoris*. Ở nghiên cứu của Bahadori năm 2018, tác giả tiến hành thu nhận KGF ở thời điểm 96 giờ trong khi nghiên cứu này thu nhận ở 72 giờ, đồng thời lượng tế bào khởi điểm trong nghiên cứu của Bahadori cao hơn gấp 1,5 lần so với nghiên cứu này. Kết quả trên cho thấy cần có thêm nhiều nghiên cứu nhằm tối ưu điều kiện biểu hiện nhằm hướng tới việc sản xuất KGF tái tổ hợp đạt hiệu quả cao.

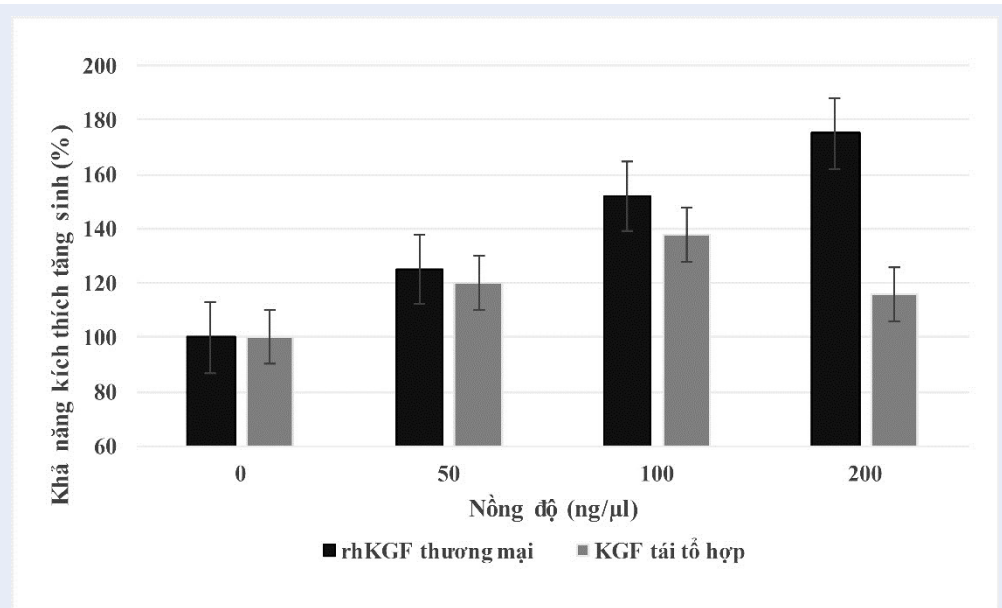
Thử nghiệm hoạt tính sinh học của KGF tái tổ hợp

Trong tự nhiên, KGF có khả năng tương tác đặc hiệu với các tế bào biểu mô thông qua thụ thể KGF (KGF-receptor), từ đó hình thành một chuỗi phản ứng, kích hoạt các con đường dẫn truyền tín hiệu KGF và thúc đẩy quá trình tăng sinh, biệt hóa tế bào. Nghiên cứu trước đây cho thấy KGF kích thích tăng sinh tế bào A549 thông qua nhận diện thụ thể KGRF trên bề mặt tế bào này [19]. Ở nghiên cứu này, trong điều kiện không có tế bào keratinocyte chúng tôi kiểm tra cấu hình tự nhiên của protein KGF tái tổ hợp thông qua việc nhận diện thụ thể KGFR trên tế bào A549. Kết quả của thử nghiệm (Hình 6) cho thấy mẫu KGF thu nhận từ dịch biểu hiện *P. pastoris* có hoạt tính kích thích tăng sinh 1,2 lần ở nồng độ 50 ng/mL, 1,38 lần ở nồng độ 100 ng/mL, trong khi mẫu chứng dương là KGF thương

mại biểu hiện từ *E. coli* (R & D systems) có hoạt tính kích thích tăng sinh ở nồng độ 50 ng/ml là 1,25 lần và tăng dần đến 1,52 lần ở nồng độ 100 ng/ml. Tuy nhiên, ở nồng độ 200 ng/mL, KGF thương mại cho hoạt tính kích thích tăng sinh 1,75 lần, trong khi KGF tái tổ hợp chỉ cho khả năng kích thích tăng sinh 1,16 lần, thấp hơn so với nồng độ 50 ng/ml và 100 ng/ml. Kết quả này có thể do sự khác biệt về dung dịch trữ giữa KGF thương mại và KGF tái tổ hợp, khác biệt về thành phần muối trong dung môi có thể gây ra sự kết tụ của các phân tử KGF tái tổ hợp khi sử dụng ở nồng độ cao và từ đó làm giảm tác động của KGF tái tổ hợp [20]. Kết quả thực nghiệm này cho thấy cần tiến hành thêm các nghiên cứu nhằm khảo sát nồng độ sử dụng tối ưu của KGF tái tổ hợp trong kích thích tăng sinh tế bào, cũng như khảo sát dung dịch lưu trữ KGF tái tổ hợp.

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu trên cho thấy chúng tôi đã tạo thành công dòng nấm men *P. pastoris* tái tổ hợp mang gen mã hóa cho protein KGF. Dưới sự kiểm soát của promoter AOX1, protein KGF tái tổ hợp được biểu hiện dưới dạng tiết và được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực Heparin với độ tinh sạch cao (> 99%) cũng như hoạt tính kích thích tăng sinh tế bào tương tự như KGF tự nhiên. Với mục tiêu ứng dụng KGF trong lĩnh vực dược phẩm và mỹ phẩm ở quy mô lớn và giảm giá thành sản phẩm, cần tăng quy mô biểu hiện và tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy có kiểm soát, cũng như xây dựng quy trình thử nghiệm hoạt tính sinh học trên nhiều mô hình khác nhau.



Hình 6: Hoạt tính sinh học của KGF tái tổ hợp trên dòng tế bào A549. Chứng âm (PBS) được xem có mức độ tăng sinh 100%. *: p-value<0,05; **:p-value<0,01

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

AOX: Alcohol oxidase

FGF: Fibroblast Growth Factor

KGF: Keratinocyte Growth Factor/ Fibroblast Growth Factor – 7

KGFR: Keratinocyte Growth Factor Receptor

LB: Luria-Bertani

MTT: Tetrazolium (3- [4,5- dimethylthiazol- 2- yl-] 2,5- diphenyltetrazolium bromide

PCR: Polymerase Chain Reaction

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả cam đoan rằng họ không có xung đột lợi ích.

ĐÓNG GÓP CỦA TÁC GIẢ

Nghiên cứu này được thiết kế bởi tác giả Đặng Thị Phương Thảo và Nguyễn Hiếu Nghĩa. Tác giả Nguyễn Phạm Anh Thư và Nguyễn Thị Thùy Trang tiến hành thu thập số liệu tại phòng thí nghiệm và xử lý kết quả. Tác giả Đặng Thị Phương Thảo và tác giả Nguyễn Phạm Anh Thư tham gia viết bản thảo.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (ĐHQG-HCM) trong khuôn khổ đề tài mã số T2019-22

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. S. Rubin, H. Osada, P. W. Finch, W. G. Taylor, S. Rudikoff, and S. A. Aaronson. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(3):802–806, 1989.
- [2] P. W. Finch and J. S. Rubin. Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor 7, a homeostatic factor with therapeutic potential for epithelial protection and repair. *Advances in cancer research*, 91:70–137, 2004.
- [3] J. S. Rubin, D. P. Bottaro, et al. Keratinocyte growth factor. *Cell biology international*, 19(5):399–412, 1995.
- [4] C. Marchese, A. Messina, A. Faggioni, et al. Human keratinocyte growth factor activity on proliferation and differentiation of human keratinocytes: differentiation response distinguishes KGF from EGF family. *Journal of cellular physiology*, 144(2):326–332, 1990.
- [5] Y. Peng, S. Wu, Q. Tang, S. Li, and C. Peng. KGF-1 accelerates wound contraction through the TGF- β 1/Smad signaling pathway in a double-paracrine manner. *Journal of Biological Chemistry*, 294(21):8361–8370, 2019.
- [6] Z. G. Feng, S. F. Pang, et al. Recombinant keratinocyte growth factor 1 in tobacco potentially promotes wound healing in diabetic rats. *BioMed research international*, 2014;.
- [7] R. Araújo, M. Lôbo, K. Trindade, D. F. Silva, and N. Pereira. Fibroblast Growth Factors: A Controlling Mechanism of Skin Aging. *Skin pharmacology and physiology*, 4(5):275–282, 2019.
- [8] S. Ceccarelli, F. Romano, A. Angeloni, and C. Marchese. Potential dual role of KGF/KGFR as a target option in novel therapeutic strategies for the treatment of cancers and mucosal damages. *Expert opinion on therapeutic targets*, 16(4):377–393, 2012.
- [9] P. W. Finch and J. S. Rubin. Keratinocyte growth factor expression and activity in cancer: implications for use in patients with solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(12):812–824, 2006.

- [10] N. Gegechkori, L. Haines, and J.J. Lin. Long Term and Latent Side Effects of Specific Cancer Types. *The Medical clinics of North America*, 101(6):1053, 2017.
- [11] A. Barasch, J. Epstein, and K. Tilashalski. Palifermin for management of treatment-induced oral mucositis in cancer patients. *Biologics: targets & therapy*, 3:111, 2009.
- [12] D. Ron, D. P. Bottaro, P. W. Finch, D. Morris, J. S. Rubin, and S. Aaronson. Expression of biologically active recombinant keratinocyte growth factor. Structure/function analysis of amino-terminal truncation mutants. *Journal of Biological Chemistry*, 268(4):2984–2988, 1993.
- [13] Y. Luo, H. H. Cho, R. B. Jones, C. Jin, and W. L. McKeenan. Improved production of recombinant fibroblast growth factor 7 (FGF7/KGF) from bacteria in high magnesium chloride. *Protein expression and purification*, 33(2):326–331, 2004.
- [14] S. Y. Han, C. Y. Jin, et al. Production of Recombinant Human Keratinocyte Growth Factor from *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) Bm5 Cells. *Journal of Life Science*, 21(6):907–911, 2011.
- [15] Y. R. Hsu, E. W. Hsu, et al. Human keratinocyte growth factor recombinantly expressed in Chinese hamster ovary cells: isolation of isoforms and characterization of post-translational modifications. *Protein expression and purification*, 12(2):189–200, 1998.
- [16] M. Ahmad, M. Hirz, H. Pichler, and H. Schwab. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(12):5301–5317, 2014.
- [17] E. El-Mansi, J. Nielsen, D. Mousdale, and R. P. Carlson. Metabolic analysis and optimization of microbial and animal cell bioprocesses, Fermentation microbiology and biotechnology. *Second ed: CRC press*, 2018.
- [18] T. D. Osslund, R. Syed, et al. Correlation between the 1.6 Å crystal structure and mutational analysis of keratinocyte growth factor. *Protein Science*, 7(8):1681–1690, 1998.
- [19] Z. Bahadori, H. R. Kalhor, and S.J. Mowla. Producing functional recombinant human keratinocyte growth factor in *Pichia pastoris* and investigating its protective role against irradiation. *Enzyme and microbial technology*, 111:12–20, 2018.
- [20] WeiWang and J. R. Chrostopher. Aggregation of therapeutic proteins. *Wiley, A Jhn Wiley & Sons, Inc, Publication*, page 369, 2010.

Heterologous expression of human KGF/FGF7 (Keratinocyte growth factor) in *Pichia pastoris*

Nguyen Pham Anh Thu¹, Nguyen Thi Thuy Trang¹, Nguyen Hieu Nghia¹, Dang Thi Phuong Thao^{1,2,*}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

ABSTRACT

Keratinocyte Growth Factor (KGF) is a paracrine-acting and epithelium-specific growth factor produced by cells of mesenchymal origin, play an important role in promoting proliferation, differentiation, motility of epithelial cells and stimulating regeneration of damaged epithelial tissues. Recent studies indicated that recombinant KGF is produced in many different expression systems such as bacteria, insect cells, plant and mammalian cells. However, KGF's yields obtained from these systems is low and production's cost is high especially in mammalian cells. In this study, the yeast *Pichia pastoris* was chosen as a host for KGF expression through induction of methanol by promoter AOX on pPICz α vector system. The results demonstrated that the *Pichia pastoris* X33:kgf transformants secreted KGF directly into BMMY medium after inducing by 0.5% methanol. The recombinant protein was purified by heparin affinity chromatography with the yield of 1.35 mg/l and the purity of 99.89% showed by SDS-PAGE. In addition, MTT assay showed the purified recombinant KGF had a proliferation effect on A549 cell line since A549 known as a cell has KGF's receptor.

Key words: Growth factor, KGF, *Pichia pastoris*, heparin

¹Department of Molecular and Environmental Biotechnology, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, VNU-HCM, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Laboratory of Molecular Biotechnology, University of Science, VNU-HCM, Ho Chi Minh City, Vietnam

Correspondence

Dang Thi Phuong Thao, Department of Molecular and Environmental Biotechnology, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, VNU-HCM, Ho Chi Minh City, Vietnam

Laboratory of Molecular Biotechnology, University of Science, VNU-HCM, Ho Chi Minh City, Vietnam

Email: dtpthao@hcmus.edu.vn

History

- Received: 01-4-2020
- Accepted: 18-5-2020
- Published: 01-7-2020

DOI : 10.32508/stdjns.v4i3.900



Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Cite this article : Thu N P A, Trang N T T, Nghia N H, Thao D T P. **Heterologous expression of human KGF/FGF7 (Keratinocyte growth factor) in *Pichia pastoris*.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 4(3):573-583.