

# BIỂU HIỆN GEN MÃ HOÁ CHO PROTEIN BẤT HOẠT RIBOSOME CỦA MƯỚP ĐẮNG TRONG NẤM MEN *PICHIA PASTORIS*

NGUYỄN VĂN ĐẠT, NGUYỄN THANH THỦY, NGUYỄN HUY HOÀNG  
NÔNG VĂN HẢI, LÊ TRẦN BÌNH VÀ TRƯƠNG NAM HẢI  
Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN&CNQG

## I. MỞ ĐẦU

Mướp đắng (*Momordica charantia* - MC) là một trong những loại cây được sử dụng từ lâu như một dược liệu ở Trung Quốc và Nam Á vào các mục đích chữa trị bệnh do virus, ung thư và tăng cường khả năng miễn dịch của người. Những nghiên cứu gần đây cho thấy hoạt tính sinh học trên của Mướp đắng là do một loại protein được tổng hợp chủ yếu trong lá thuộc loại protein bất hoạt ribosôm (Ribosome Inactivating Protein - RIP). Protein này đã được tinh chế từ dịch lá cây Mướp đắng và có phân tử lượng là 30 kDa [1]. Thử nghiệm trên tế bào nuôi cấy cho thấy nó có hoạt tính kháng HIV và vì vậy được ký hiệu là MAP30 (Mormordica Anti-HIV Protein) [2]. Tương tự như một protein kháng HIV khác (GAP31) tách từ *Gelonium multiflorum*, MAP 30 có hoạt tính đối với cả hai loại cơ chất là ADN và ARN. Ngoài ra MAP 30 còn có hoạt tính N-glycosidase đặc hiệu lên liên kết glycosit giữa ribosôm và A<sup>4324</sup> hay G<sup>4323</sup> của rARN 28S trong hệ vô bào [3] và ức chế sinh tổng hợp *in vitro* protein tế bào nhân thật. Hoạt tính này của MAP30 rất đặc trưng đối với các RIP đơn chuỗi có nguồn gốc thực vật [4] và chỉ được phát hiện trong hệ sinh tổng hợp vô bào. MAP30 không gây ảnh hưởng đến tổng hợp protein của tế bào bình thường, bởi vì chúng không đi vào trong các tế bào. Nghiên cứu của Rybak và cs cho thấy MAP30 còn có hoạt tính chống ung thư mạnh đối với một vài dòng tế bào ung thư người [5].

Vì những đặc tính quan trọng trên của MAP30 nên việc thu nhận lượng lớn protein này là cần thiết đối với thực tiễn y học. Thế nhưng, do hàm lượng của chất này trong các dịch chiết từ cây rất thấp cho nên việc tổng hợp nó trong các hệ biểu hiện vi sinh với lượng lớn là có ý nghĩa. Trong thông báo này chúng tôi trình bày các kết quả về tạo dòng gen MAP30 từ ADN genom của Mướp đắng và biểu hiện nó trong nấm men *Pichia pastoris* với mục đích tạo ra chủng sản cao loại protein quý này.

## II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 1. Các nội vi sinh, plasmit, môi trường và hoá chất

Nồi *E. coli* DH5 $\alpha$  có kiểu gen [*endA1recA1hsdR17supE44gyrA96thi-1relA1lacU169*( $\phi$ 80 *lacZ* $\Delta$ M15)] được sử dụng trong các thí nghiệm biến nạp và nhân plasmit.

Nồi *P. pastoris* GS115 (*his 4*) trong bộ chuẩn của Invitrogen (Mỹ) được sử dụng để biểu gen mã hoá cho MAP30.

Các plasmit sử dụng trong công trình: pUC118 (Takara, Nhật Bản) dùng để nhân dòng các sản phẩm PCR, pPIC9 (Invitrogen, Mỹ) dùng để biểu hiện gen MAP30 trong nấm men *P. pastoris*.

Môi trường nuôi cấy: Môi trường LB chứa 1% tryptone, 0,5% cao nấm men, 1% NaCl; bổ xung 2% agar, 50  $\mu$ g/ml ampicilin nếu cần. Môi trường MD chứa 2% glucose, 1.34% YNB,  $4 \times 10^{-5}$ % biotin, 1.5 % agar. Môi trường YPD chứa 1% cao nấm men, 2% peptone, 2% glucoza; bổ xung agar đến 1,5% nếu cần. Môi trường BMGY chứa 1% yeast extract, 2% pepton, 1% glycerol, 1.34% YNB,  $4 \times 10^{-5}$ % biotin, 100 mM đệm kali photphat pH 6,0. Môi trường BMMY có thành phần tương tự môi trường BMGY, chỉ khác là thay glycerol bằng methnol.

Các enzym hạn chế, T4 ADN ligaza của New England Biolabs (Mỹ), photphotaza kiềm (Calf intestine alkaline phosphotase - CIP) của Boehringer Mannheim (Đức).

### 2. Các phương pháp liên quan đến ADN

Các phản ứng cắt, nối ADN, điện di trên gel agarosa, biến nạp ADN chủ yếu được tiến hành theo mô tả trong sách của Sambrook và cs [6].

ADN genom Mướp đắng được tách chiết theo phương pháp của Backer và cs [7].

Phản ứng tổng hợp chuỗi (PCR) được tiến hành trên máy MJ Research (Mỹ) có sử dụng bộ chuẩn GenAmp kit (Perkin-Elmer Cetus, Mỹ). Điều kiện tiến hành phản ứng như sau: 96°C trong 1 phút, 25 chu trình gồm 94°C trong 1 phút, 56°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút; kết thúc phản ứng ở 72°C trong 5 phút.

Trình tự nucleotid được xác định theo phương pháp kết thúc chuỗi của Sanger và cs [8] và được thực hiện trên máy đọc gen tự động AL Express (Pharmacia Biotech, Thụy Điển) với bộ chuẩn (No. 27-2693-02, Pharmacia Biotech) theo hướng dẫn của hãng cung cấp.

**Biến nạp plasmit vào P. pastoris GS 115**

Plasmit được biến nạp vào P. pastoris GS 115 theo phương pháp mô tả trong bộ chuẩn của hãng cung cấp. Sản phẩm biến nạp được cấy trải trên môi trường MD chứa 2% thạch và ủ ở 30°C. Sau 3 ngày sẽ xuất hiện khuẩn lạc của các thể biến nạp.

**Biểu hiện gen trong P. pastoris GS115**

Chọn ngẫu nhiên 12 thể biến nạp để nuôi cấy trong 1 ml môi trường BMGY, nuôi lác 200 vòng/phút ở 30°C trong 24 giờ. Ly tâm 1500 vòng/phút trong 5 phút để thu tế bào. Cảm ứng thể biến nạp bằng cách dịch hoá tế bào trong môi trường BMMY đến OD<sub>600</sub> đạt 1 và nuôi tiếp ở 30°C trong 72 giờ. Sau 24 giờ thì bổ sung thêm methanol đến nồng độ cuối cùng là 1%. Các mẫu protein được lấy ra tại các điểm 6, 12, 24, 36, 48, 60 và 72 giờ sau cảm ứng để tiến hành phân tích bằng điện di.

**3. Điện di protein**

Protein từ các mẫu cảm ứng được phân tích bằng điện di trên gel acrylamid biến tính (PAGE-SDS) 12,6% theo phương pháp của Laemmli [9].

**III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

Thiết kế plasmit pPICMAP30:

Chúng tôi tiến hành nhân gen mã hoá cho protein thành thực của MAP30 từ ADN genom Mướp đắng bằng PCR nhờ cặp mồi được thiết kế trên cơ sở trình tự gen MAP30 đã công bố [2] và có trình tự như sau:

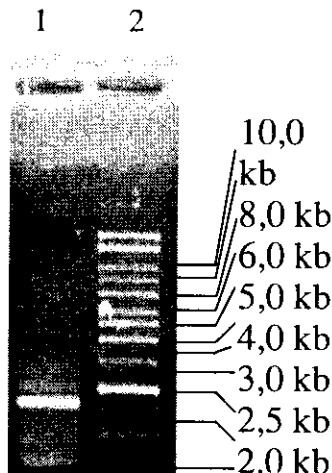
PICMAP-5': 5'-CGAATTCGCCAAAGGCGATGTTAAC-3'

*EcoR I*

PICMAP-3': 5'-CGAATTCTCAATTCACAACAGATAC-3'

*EcoR I*

Cặp mồi trên cho phép nhân lên đoạn ADN mã hoá cho MAP30 bắt đầu từ axit amin Alanin ở vị trí 21 trong tiền phân tử của MAP30 mà không chứa đoạn tín hiệu tiết. Ở cây Mướp đắng, đây là vị trí nhận biết để peptidaza cắt tiền phân tử tại axit amin ở vị trí 23 trong MAP30 thành protein thuần thực. Với cặp mồi này khi sử dụng ADN genom của Mướp đắng để làm khuôn trong phản ứng tổng hợp chuỗi ta sẽ nhận được đoạn ADN có kích thước khoảng 800 bp. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên hình 1 cho thấy bằng cặp mồi trên đã thu nhận được băng ADN đặc trưng có kích thước theo tính toán.



**Hình 1. Nhân đoạn ADN mã hoá cho protein thuần thực của MAP30 bằng PCR**  
 1: Sản phẩm PCR, 2: Thang ADN chuẩn

Trên cơ sở sản phẩm PCR tạo được, chúng tôi tiến hành nhân dòng gen Map30 nhờ plasmid pUC118. Sản phẩm PCR được gắn vào pUC118 tại vị trí cắt *Hinc* II nhờ enzym gắn T4 ligaz, sau đó nó được biến nạp vào *E.coli* để nhân dòng. Do ở hai đầu của các đoạn mới (PICMAP-5' và PICMAP3') dùng để nhân gen MAP30 được thiết kế thêm điểm cắt *EcoR* I, nên ADN plasmid của các thể biến nạp được tách chiết và kiểm tra bằng cách cắt với *EcoR* I để tìm dòng mang gen MAP30. Thể biến nạp đúng sẽ là dòng có ADN plasmid mà sau khi cắt bằng *EcoR* I sẽ cho ra 2 đoạn ADN có kích thước khoảng 3,3 và 0,8 kb.

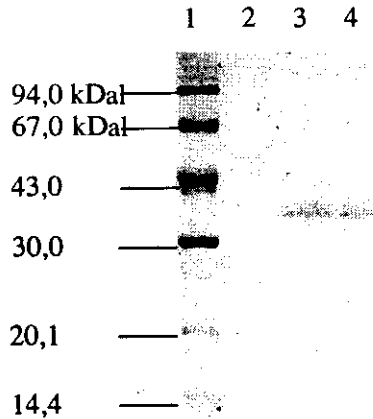
Kết quả điện di sản phẩm ADN plasmid của các thể biến nạp cắt bằng *EcoR* I cho thấy đa số các dòng đều cho ra 2 đoạn ADN có kích thước 3,3 kb và 0,8 kb. Chúng tôi tỷ lệ tạo dòng các sản phẩm PCR trong pUC118 cắt bằng *Hinc* II là rất cao.

Do đoạn ADN 0,8 kb được gắn vào pUC118 tại vị trí *Hinc* II nên nó có thể gắn vào theo chiều xuôi hoặc ngược. Trong gen MAP30 và pUC118 đều có 1 điểm cắt *Hind* III nên khi cắt bằng *Hind* III thì dòng mang gen gắn theo chiều xuôi sẽ cho ra hai băng ADN có kích thước là 524 và 3546 bp; còn theo chiều ngược lại sẽ cho 2 băng như có kích thước 346 và 3724 bp. Chúng tôi nhận thấy toàn bộ 30 dòng biến nạp thu được đều có đoạn gen MAP30 gắn vào pUC118 theo chiều ngược. Có thể là các tế bào chủ có sự chọn lọc nhất định đối với chiều gắn của đoạn gen MAP30.

Chúng tôi đã chọn 1 dòng pUCMAP30 từ 30 dòng đã kiểm tra để sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo. Đoạn gen Map30 trong pUCMAP30 được thu nhận bằng cách cắt plasmid này với *EcoR* I, sau đó điện di để tách băng 0,8 kb chứa gen MAP30. Đoạn gen thu được được đưa vào vector biểu hiện pPIC9 cũng được cắt bằng *EcoR* I. Sau khi đã kiểm tra chiều gắn của gen MAP30 trong pPIC9 từ 23 thể biến nạp, chúng tôi thu được 9 dòng mang gen MAP30 gắn theo chiều xuôi trong tổ hợp pPICMAP30. Từ 9 dòng này chúng tôi đã chọn 1 dòng để biến nạp vào nấm men *P. pastoris*.

#### Biến nạp pPICMAP30 vào *P. pastoris* GS115 và nghiên cứu sự biểu hiện

pPIC9 thuộc loại vector tích hợp, nên trước khi biến nạp chúng tôi mở vòng plasmid này bằng *Stu* I để tăng hiệu quả tích hợp vào nhiễm sắc thể của *P. pastoris*. Sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường chọn lọc chúng tôi đã thu được các thể biến nạp. Nhặt ngẫu nhiên 12 dòng để nghiên cứu khả năng biểu hiện của chúng.



Hình 2. Điện di protein ngoại bào của thể biến nạp *P. pastoris* mang gen MAP30

1. Trọng lượng phân tử protein chuẩn
2. Dịch ngoại bào trước khi cảm ứng
3. Dịch ngoại bào sau khi cảm ứng 24 giờ bằng methanol
4. Dịch ngoại bào sau khi cảm ứng 48 giờ bằng methanol

Kết quả điện di protein ngoại bào trên hình 2 cho thấy sau 24 giờ cảm ứng xuất hiện băng protein đậm có kích thước khoảng 34 kDa, còn ở trong dịch protein trước cảm ứng không xuất hiện băng protein tương ứng. Sản phẩm protein biểu hiện thu được tương đối sạch và chiếm hơn 90 % protein ngoại bào tổng số. Kết quả này rất thuận tiện cho việc tinh chế để nghiên cứu hoạt tính sinh học của protein tái tổ hợp thu được.

Tuy nhiên theo tính toán thì đoạn gen mã hoá cho phân tử protein thành thực của MAP30 có kích thước khoảng 800 bp nên khi biểu hiện sẽ cho ra phân tử protein có kích thước khoảng 29 kDa. Trong trường hợp của

MAP30, protein thu được có kích thước khoảng 34 kDa. Điều này có thể được giải thích là do có sự glycozil hoá protein sau dịch mã trong tế bào *P. pastoris*. Trong nấm men hiện tượng glycozil hoá protein xảy ra rất phổ biến nếu trong cấu trúc của nó có điểm nhận biết đặc hiệu Asn-X-Ser/Thr. Theo kết quả đã công bố thì trong cấu trúc của MAP30 có 1 điểm nhận biết này ở vị trí 51-53 (Asn-Leu-Thr) [2]. Vì vậy, rất có thể phân tử MAP30 biểu hiện trong nấm men *Pastoris* đã được glycozil hoá.

Chúng tôi đã biểu hiện thành công gen MAP30 của Mướp đắng trong nấm men *P. pastoris*, sản phẩm protein của nó được tiết ra môi trường và chiếm lượng chủ yếu trong dịch protein ngoại bào. Điều này mở ra triển vọng thu nhận MAP30 với lượng lớn để tiến hành nghiên cứu và thử nghiệm các hoạt tính sinh học của nó.

Công trình này được thực hiện tại Phòng Kỹ thuật di truyền, Viện Công nghệ Sinh học với sự tài trợ kinh phí của Chương trình nghiên cứu cơ bản, năm tài khoá 1999.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sylvia Lee-Huang, P. L. Huang, P. L. Nara, H. Chen, H. Kung, P. Huang, H. I. Huang and P. L. Huang., 1990. FEBS Letters, V. 237, N. 1,2: 12-18.
2. Sylvia Lee-Huang, P. L. Huang, H. Chen, P. Huang, H. I. Huang and P. L. Huang, 1995. Gene 164:151-156.
3. Endo Y., K. Mutsui, M. Motizuki and K. Tsurugi, 1987. J. Biol. Chem. 262:5908-5912.
4. Barbieri L., P. Gorini, P. Valbonesi, P. Castiglo and F. Stripe, (1994). Nature 372:624.
5. Rybak S. M., J. J. Lin, D. L. Newton, H. F. Kung, A. Monks, H. C. Chen, P. L. Huang and S. Lee-Huang 1994. Int. J. Oncol. 5:88-94.
6. Sambrook J., E.F. Fritsch and T. Maniatis 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
7. Backer C., A. D. Shutov, V. H. Nong, V. L. Senyuk, R. Jung, C. Horstmann, J. Fisher, N. C. Nielsen, K. Muntz., (1995) Biochem. 288:456-462.
8. Sanger F., S. Nicklen and A. R. Coulson., 1977. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467.
9. Laemmli U. K., (1970). Nature 227: 680-685.

### SUMMARY

## EXPRESSION OF BITTER MELON RIBOSOME INACTIVATING PROTEIN IN YEAST *PICHIA PASTORIS*

NGUYEN VAN DAT, NGUYEN THANH THUY, NGUYEN HUY HOANG,  
NONG VAN HAI, LE TRAN BINH AND TRUONG NAM HAI  
*Institute of Biotechnology, CNST*

*Ribosome inactivating protein gene was cloned from the bitter melon Momordica charantia by PCR and was expressed successfully in yeast P. pastoris. The synthesised protein was glycosylated and secreted into medium. It opened possibility for producing this protein in large amount for its study and application.*