

NGHIÊN CỨU TÁI GẤP CUỘN PROTEIN LEPTIN NGƯỜI TÁI TỔ HỢP TỪ THỂ VÙI CỦA *Escherichia coli*

Lê Mai Hương Xuân, Đặng Thị Phương Thảo*, Trần Linh Thuộc

Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG tp. Hồ Chí Minh,

*thaodp@hcmus.edu.vn.

TÓM TẮT: Leptin là một hormone có bản chất protein, được tiết ra chủ yếu từ mô mỡ, có vai trò quan trọng trong điều hòa lượng thức ăn và quá trình tiêu hao năng lượng của cơ thể. Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu sản xuất protein leptin tái tổ hợp trong hệ thống vi khuẩn *Escherichia coli* nhằm tạo ra nguồn nguyên liệu có chất lượng tốt cho các nghiên cứu phát triển các sản phẩm điều hòa thể trọng ở người. Việc biểu hiện ở mức cao protein leptin tái tổ hợp trong *E. coli* dẫn đến sự hình thành thể vùi. Vì vậy, việc nghiên cứu để tìm ra các điều kiện hòa tan và tái gấp cuộn protein leptin từ dạng thể vùi giữ vai trò then chốt trong toàn bộ quá trình sản xuất protein leptin tái tổ hợp từ *E. coli*. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, thể vùi leptin có thể hòa tan bằng dung dịch urea 2M pH 12,5, sau đó tái gấp cuộn bằng phương pháp pha loãng hoặc phương pháp thâm tích. Sản phẩm tái gấp cuộn được khẳng định bằng điện di SDS-PAGE có khử và không khử cầu nối disulfide, điện di Native-PAGE kiểm tra cấu hình, xác định mức độ protein kết cụm thông qua OD₃₄₀, xác định nồng độ protein bằng thuốc thử Bradford. Hiệu quả tái gấp cuộn của phương pháp pha loãng là 56,02% và phương pháp thâm tích là 43,15%. Kết quả nghiên cứu này là tiền đề cho các nghiên cứu phát triển sản phẩm leptin tái tổ hợp sau này.

Từ khóa: Chất biến tính, protein hòa tan, tái gấp cuộn, thể vùi.

MỞ ĐẦU

Leptin có vai trò quan trọng trong việc điều hòa thể trọng ở người. Thông qua vùng dưới đồi leptin điều chỉnh nhu cầu ăn uống và sự tiêu hao năng lượng của cơ thể. Nhu cầu ăn uống được điều hòa bởi các peptide thần kinh ở vùng dưới đồi như NPY (neuropeptide Y), AgRP (agouti-related peptide) và MSH (alpha-melanocortin stimulating hormone) [1]. Khi chất béo trong cơ thể tăng lên, lượng leptin cũng tăng lên, dẫn đến ức chế sự biểu hiện của NPY và AgRP, và tăng cường sự biểu hiện của MSH. Điều này dẫn đến quá trình tiêu thụ thức ăn giảm xuống, gia tăng tiêu hao năng lượng.

Từ những đặc điểm về hoạt động chức năng, leptin ngày càng được quan tâm nghiên cứu sử dụng làm thuốc điều trị bệnh béo phì [4]. Tổ chức Y tế thế giới (WHO) định nghĩa béo phì là tình trạng tích lũy mỡ quá mức và không bình thường tại một vùng cơ thể hoặc toàn thân đến mức ảnh hưởng đến sức khỏe. Người bị béo phì ngoài thân hình phì nộn, nặng nề, còn có nguy cơ mắc nhiều bệnh như rối loạn lipid máu, tăng huyết áp, tai biến mạch máu, sỏi mật, đái tháo đường, xương khớp và ung thư. Theo Viện Dinh dưỡng quốc gia Việt Nam, bệnh béo phì

đã đạt xấp xỉ 16,3% số lượng người trưởng thành Việt Nam vào năm 2005 [13].

Leptin đã thể hiện được ưu thế trong điều trị béo phì bởi nó là một hợp chất sinh học, có thể được sản xuất bằng công nghệ DNA tái tổ hợp, từ đó cho giá thành rẻ và thân thiện với con người hơn các loại thuốc tổng hợp hóa học khác. Nhằm mục đích tạo ra nguồn leptin dồi dào có chất lượng cao để phục vụ cho việc nghiên cứu phát triển các sản phẩm điều hòa thể trọng ở người, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu sản xuất protein leptin người tái tổ hợp từ vi khuẩn *Escherichia coli*. Gần đây, chúng tôi đã thành công trong việc tạo được dòng *E. coli* BL21(DE3)/pET-*hob*, dòng vi khuẩn này có khả năng biểu hiện protein leptin người tái tổ hợp ở dạng thể vùi [10], là dạng protein bị kết cụm, không có cấu hình đúng và không có hoạt tính sinh học.

Leptin sau khi dịch mã có 167 amino acid với chuỗi tín hiệu tiết dài 21 amino acid, sau đó chuỗi peptide tiết bị thủy phân, do đó protein leptin tuần hoàn trong máu có 146 amino acid, lưu thông ở cả hai dạng: dạng tự do và dạng phức hợp khi liên kết với protein mang [12]. h-leptin có khối lượng phân tử 16 kD, không đòi

hỏi sự glycosyl hóa, cấu trúc bậc ba gồm bốn chuỗi xoắn alpha đối song theo kiểu “up-up-down-down”. Phân tử protein có một vùng kỵ nước được tạo thành từ những tương tác kỵ nước của các amino acid trong các chuỗi xoắn. Trong phân tử có hai cysteine tạo thành cầu nối disulfide là Cys96-Cys146 [3].

Tái gấp cuộn là quá trình chuyển đổi protein từ trạng thái không gấp cuộn thành trạng thái gấp cuộn đúng. Tái gấp cuộn *in vitro* được diễn ra trong dung dịch tái gấp cuộn nhờ thành phần của nó có cặp oxy hóa-khử thiol giúp tạo cầu nối disulfide nội phân tử. Đồng thời sự tái gấp cuộn còn cần được hỗ trợ thêm bởi các tác nhân hỗ trợ, chủ yếu là tác nhân vật lý như nhiệt độ, áp suất và tác nhân hóa học như urea, sucrose [8]. Nguyên tắc của tái gấp cuộn là giảm dần nồng độ của protein không ở dạng gấp cuộn, đồng thời giảm dần nồng độ chất biến tính để protein không ở dạng gấp cuộn có thể tiến hành tái gấp cuộn đúng. Từ nguyên tắc đó, một số phương pháp tái gấp cuộn được sử dụng phổ biến là phương pháp pha loãng, thẩm tích và sắc ký.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các nghiên cứu tái gấp cuộn protein leptin từ thể vùi. Các dữ liệu thực nghiệm này cung cấp cơ sở cho việc thu nhận protein leptin có hoạt tính sinh học sau này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sử dụng chủng *E. coli* BL21(DE3) có mang vector tái tổ hợp pET-*hob* biểu hiện protein leptin tái tổ hợp, lưu giữ tại bộ môn Công nghệ sinh học phân tử và Môi trường, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG tp. Hồ Chí Minh.

Biểu hiện và thu nhận thể vùi mục tiêu

Chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET-*hob* được nuôi cấy trong 300 ml môi trường LB (trypton 10 g/l, NaCl 5 g/l, cao nấm men 5 g/l) có bổ sung kháng sinh kanamycin 30 µg/ml. Khi OD₆₀₀ đạt 0,8, tiến hành cảm ứng bằng IPTG (Promega) 0,5M. Sau 16 giờ nuôi cấy, thu nhận sinh khối vi khuẩn. Hòa sinh khối trong 500 ml dung dịch đệm (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), sau đó phá tế bào bằng máy phá tế bào áp suất Model M-110EH-30

Microfluidizer Processor (Hoa Kỳ) và hệ thống làm lạnh đi kèm. Ly tâm thu nhận phân đoạn tủa, đây chính là thể vùi của protein leptin. Thể vùi thu được được rửa bằng dung dịch Triton X-100 1% nhằm loại bỏ một số protein của tế bào.

Hòa tan thể vùi

Chúng tôi tiến hành hòa tan thể vùi trong dung dịch Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM bổ sung một số loại tác nhân biến tính thường được sử dụng để hòa tan thể vùi như dung dịch guanidine chloride 6M pH 8,5 (GuHCl), dung dịch N-lauryl sarcosine 0,5% pH 8,5 (NLS), dung dịch urea 8M pH 8,5 và urea pH 12,5 ở các nồng độ 4M và 2M. Ở bước khảo sát này, chúng tôi cân 30mg thể vùi tươi và hòa tan trong 1,5 ml dung dịch hòa tan, đảo nhẹ liên tục trong 2 giờ ở 30°C, ly tâm thu phần dịch nổi. Đánh giá hàm lượng protein hòa tan từ thể vùi bằng phương pháp đo mật độ quang OD₂₈₀ và phân tích bằng điện di SDS-PAGE.

Sau khi xác định dung dịch hòa tan thể vùi leptin thích hợp, chúng tôi sử dụng dung dịch hòa tan đã chọn được để khảo sát tỷ lệ hòa tan thể vùi tươi trong dung dịch hòa tan (w/v: trọng lượng trên thể tích) nhằm chọn ra tỷ lệ hòa tan đạt hiệu quả cao nhất về mặt kỹ thuật và kinh tế. Chúng tôi khảo sát tỷ lệ thể vùi tươi từ 20 mg-100 mg trong 1 ml dung dịch hòa tan. Đánh giá hiệu quả hòa tan thể vùi bằng phương pháp đo mật độ quang OD₂₈₀ và điện di SDS-PAGE.

Tái gấp cuộn thể vùi đã được hòa tan

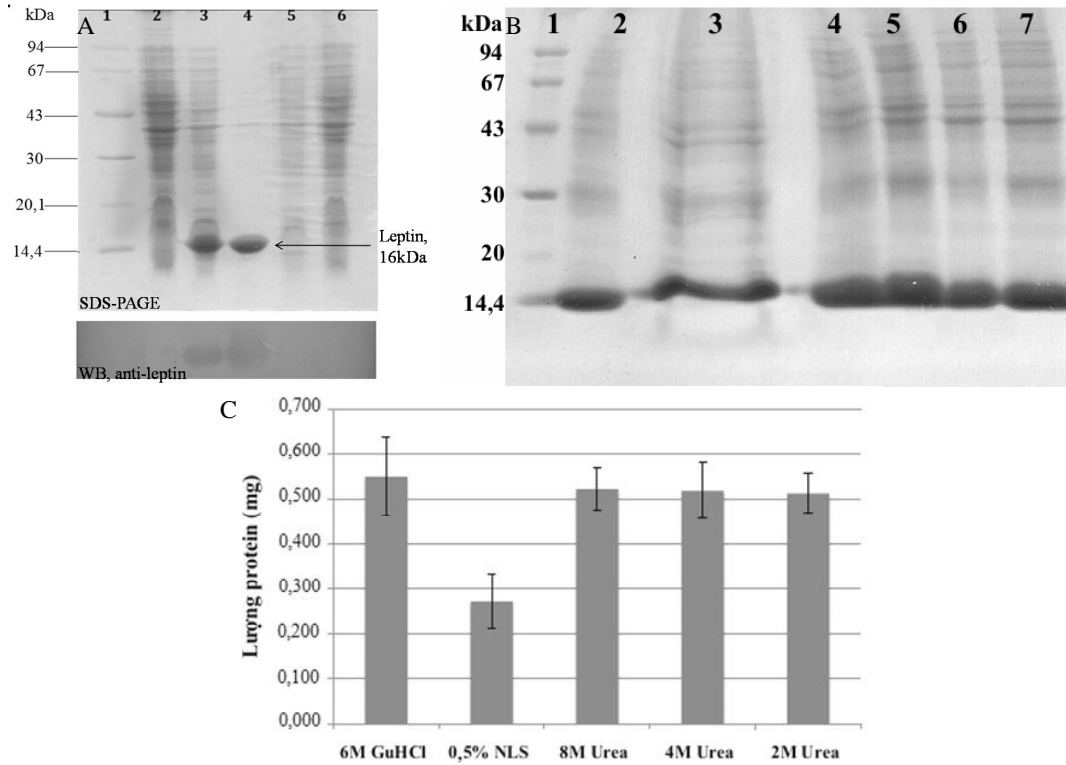
Chúng tôi sử dụng dung dịch tái gấp cuộn protein gồm bốn thành phần chính: cặp oxy-hóa khử cysteine 5 mM - cystine 0,5 mM, urea 2M là thành phần ngăn cản sự tạo thành kết cụm protein, sucrose 10% là thành phần thúc đẩy quá trình tái gấp cuộn, đệm Tris-HCl 50 mM và EDTA 1 mM, pH 8,5 [11]. Chúng tôi tái gấp cuộn protein leptin bằng hai phương pháp: phương pháp pha loãng nhanh và phương pháp thẩm tích. Nạp 500 µl dung dịch thể vùi đã hòa tan vào 4.500 µl dung dịch tái gấp cuộn (tỷ lệ nạp 1:10 theo thể tích), khuấy nhẹ (đối với phương pháp pha loãng) hoặc chuyển dung dịch vào màng thẩm tích có lỗ màng 3 kDa (Spectra, Hoa Kỳ), thẩm tích với 500 ml dung dịch đệm. Tiến hành tái gấp cuộn ở ba nhiệt độ 15°C, 18°C và 22°C. Sau 16 giờ, chỉnh pH dung dịch

về 7,5 để dừng phản ứng tái gấp cuộn. Ly tâm, thu nhận phần dịch nổi. Sản phẩm tái gấp cuộn được đánh giá bằng điện di SDS-PAGE có khử và không khử cầu nối disulfide thông qua tác động của DTT (Dithiothreitol), điện di Native-PAGE kiểm tra cấu hình, xác định mức độ

protein kết cụm thông qua OD₃₄₀, xác định nồng độ protein bằng thuốc thử Bradford nhằm đánh giá hiệu quả thu hồi protein theo khối lượng.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xác định dung dịch hòa tan thể vùi leptin



Hình 1. Khảo sát khả năng hòa tan thể vùi chứa leptin tái tổ hợp

A. Biểu hiện protein leptin tái tổ hợp trong *E. coli*. 1: Thang protein phân tử lượng thấp; 2: *E. coli* BL21(DE3)/pET-*hob* (-IPTG; 3: *E. coli* BL21(DE3)/pET-*hob* (+)IPTG (pha tổng); 4: *E. coli* BL21(DE3)/pET-*hob* (+)IPTG (pha tủa); 5: *E. coli* BL21(DE3)/pET-*hob* (+)IPTG (pha tan); 6: *E. coli* BL21(DE3) (+)IPTG. B. Kết quả điện di SDS-PAGE mẫu hòa tan thể vùi leptin bằng các loại dung dịch hòa tan. 1: Thang protein khối lượng phân tử thấp; 2: Thể vùi leptin trước hòa tan; 3-4: Mẫu thể vùi hòa tan bằng GuHCl 6 M và N-lauryl sarcosine 0,5%; 5-7: Mẫu thể vùi hòa tan bằng urea ở các nồng độ 8 M, 4 M, 2 M. C. Đánh giá tương quan lượng protein hòa tan từ thể vùi trong các loại dung dịch hòa tan.

Thể vùi là dạng protein bị kết cụm lại do các liên kết liên phân tử, chủ yếu là liên kết disulfide và các bề mặt kỵ nước của phân tử protein. Vì vậy, thể vùi thường chứa các protein không có cấu hình đúng và không có hoạt tính sinh học. Để thu nhận protein có hoạt tính từ thể vùi, cần trải qua quá trình tái gấp cuộn để đưa phân tử về dạng có cấu hình đúng thông qua việc tái tạo cầu nối disulfide tại các vị trí cần

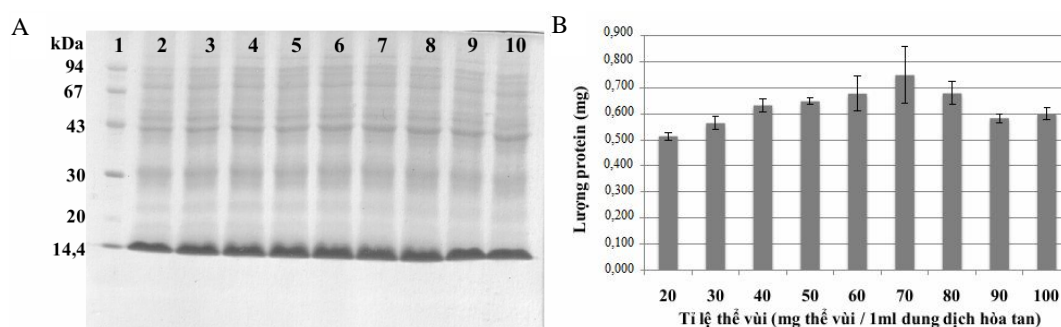
thiết trong phân tử protein. Để tái gấp cuộn, trước hết, thể vùi cần được hòa tan với dung dịch biến tính nhằm phá vỡ tất cả các liên kết disulfide sai, từng phân tử sẽ được tách riêng rẽ, như vậy, khi điều kiện tái gấp cuộn được thiết lập thì các cầu nối disulfide nội phân tử sẽ hình thành, protein trở về dạng cấu hình đúng tự nhiên của nó. Các dung dịch biến tính thường được sử dụng cho hòa tan thể vùi như dung dịch

guanidine chloride 6M, dung dịch urea 8M và dung dịch N-lauryl sarcosine 0,5% [8]. Trong thí nghiệm của chúng tôi, leptin tái tổ hợp từ thể vùi đã được hòa tan trong ba loại dung dịch biến tính (hình 1B, giếng 3, 4, 5). Các mẫu thể vùi được hòa tan bằng GuHCl 6M, NLS 0,5% và urea 8M đều cho vạch protein to đậm ở khoảng kích thước 16 kDa, là kích thước của protein leptin. Bên cạnh đó, theo Panda & Singh (2005) [7], urea ở nồng độ thấp (1-3 M) sẽ không hoàn toàn phơi bày bề mặt kỵ nước của protein giúp chúng tránh được việc xảy ra những tương tác không mong muốn, đặc biệt là tương tác kỵ nước tạo thành kết cụm protein hay những cấu hình gấp cuộn ngẫu nhiên. Với mong muốn giảm nồng độ chất biến tính trong bước hòa tan để thuận lợi hơn trong bước tái gấp cuộn, chúng tôi tiến hành hòa tan thể vùi leptin với dung dịch urea 4M và 2M, pH 12,5. Kết quả điện di SDS-PAGE (hình 1B, giếng 6, 7) đã cho thấy,

mặc dù nồng độ urea thấp nhưng dung dịch được đưa về pH kiềm mạnh vẫn có thể hòa tan thể vùi tốt.

Hiệu quả hòa tan thể vùi leptin được đánh giá thông qua giá trị OD₂₈₀, với $\lambda = 280$ là bước sóng hấp thụ cực đại protein dạng tan. Lượng protein hòa tan thu được từ thể vùi trong dung dịch NLS 0,5% là thấp nhất ($0,273 \pm 0,060$). Sử dụng dung dịch hòa tan chứa GuHCL 6 M và urea ở các nồng độ 8M, 4M và 2M có thể thu nhận được lượng protein hòa tan gấp hai lần so với NLS 0,5%. Hàm lượng protein hòa tan trong các dung dịch GuHCL 6M và các dung dịch chứa urea không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê (hình 1C). Với kết quả thực nghiệm này, chúng tôi chọn sử dụng dung dịch có hàm lượng chất biến tính thấp nhất (dung dịch urea 2M, pH 12,5) trong các khảo sát hòa tan và tái gấp cuộn protein leptin tiếp theo.

Xác định tỷ lệ thể vùi hòa tan



Hình 2. Khảo sát tỷ lệ hòa tan thể vùi chứa leptin trong dung dịch chứa urea 2M (w/v: khối lượng thể vùi/thể tích dung dịch hòa tan)

A. Kết quả điện di SDS-PAGE các mẫu hòa tan thể vùi leptin ở các tỷ lệ khác nhau; 1: Thang protein khối lượng phân tử thấp; 2-10: tỷ lệ thể vùi 20-100 mg/ml dung dịch hòa tan. B. Đánh giá tương quan lượng protein tan từ thể vùi ở các tỷ lệ hòa tan khác nhau.

Thông thường, thể vùi có xu hướng hòa tan dễ dàng và hiệu quả cao trong các dung dịch hòa tan với tỷ lệ hòa tan thấp. Điều đó có nghĩa là gia tăng thể tích dung dịch hòa tan sẽ có khả năng hòa tan toàn bộ protein trong thể vùi. Tuy vậy, thể tích dịch protein trong thực nghiệm cũng là vấn đề đáng quan tâm, có tính quyết định đến hiệu quả và tính kinh tế trong quy mô sản xuất. Thể tích dịch protein hòa tan từ thể vùi càng lớn, hàm lượng protein mục tiêu càng giảm và gây ảnh hưởng đến quá trình tái gấp

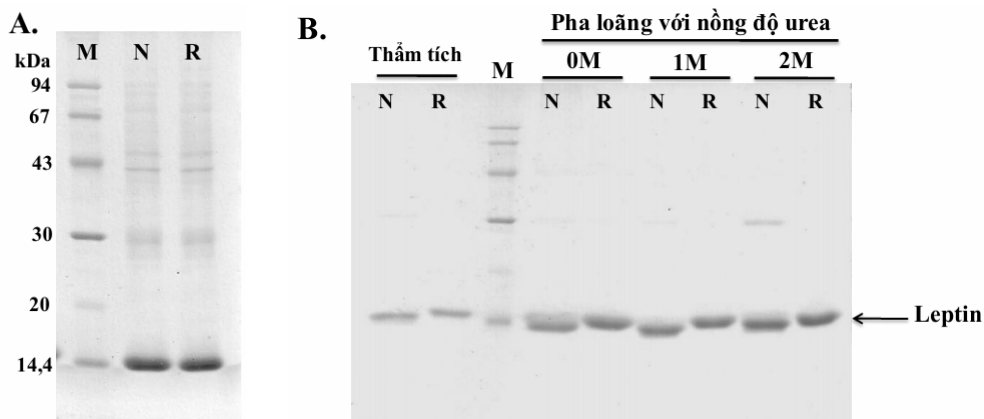
cuộn và tinh chế trong các bước sau. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát hòa tan thể vùi trong dung dịch chứa urea 2M, pH 12,5 ở các tỷ lệ khác nhau nhằm xác định tỷ lệ hòa tan thấp nhất có thể thu nhận hiệu quả protein leptin tan. Các tỷ lệ thể vùi hòa tan được khảo sát từ 20 mg đến 100 mg trong 1 ml dung dịch hòa tan. Kết quả hòa tan thể vùi ở các tỷ lệ khác nhau được thể hiện ở hình 2A cho thấy, thể vùi leptin đã được hòa tan ở tất cả các tỷ lệ khảo sát. Bên cạnh đó, khi so sánh lượng

protein trung bình ở các tỷ lệ thể vùi hòa tan (hình 2B) cho thấy, tỷ lệ 20 mg/ml cho lượng protein thấp nhất $0,514 \pm 0,014$ (mg), hàm lượng protein tăng dần khi tỷ lệ tăng lên đến 40 mg/ml. Sau đó, mặc dù lượng thể vùi có tăng lên nhưng nồng độ protein trung bình của các mẫu thí nghiệm không thay đổi, thậm chí ở tỷ lệ 90 mg/ml và 100 mg/ml nồng độ protein có xu hướng giảm. Vì vậy, chúng tôi sẽ chọn tỷ lệ thể vùi hòa tan là 40 mg thể vùi tươi trong 1 ml dung dịch hòa tan, lượng protein trong mẫu sau khi hòa tan đạt $0,633 \pm 0,024$ (mg).

Tái gấp cuộn thể vùi leptin đã được hòa tan

Sự tái gấp cuộn protein được tiến hành theo nguyên tắc tách rời các phân tử protein, giảm dần nồng độ chất biến tính, tạo môi trường oxy-hóa khử để hình thành cầu nối disulfide nội phân tử. Các công bố trước đây cho thấy phân tử leptin có hai cysteine ở vị trí 96 và 146, hai cysteine này tạo một cầu nối disulfide nội phân tử và không có cysteine tự do [3]. Do đó, việc tái gấp cuộn protein leptin dự đoán không đòi hỏi kỹ thuật phức tạp. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng hai phương pháp tái gấp cuộn

đơn giản và được sử dụng phổ biến hiện nay là phương pháp pha loãng và phương pháp thâm tích. Protein leptin sau tái gấp cuộn được phân tích bằng khảo sát sự tồn tại của cầu nối disulfide nội phân tử thông qua tác động của DTT. Protein leptin trước và sau tái gấp cuộn được điện di SDS-PAGE với sự có mặt và không có mặt của tác nhân khử cầu nối disulfide là DTT. Kết quả điện di (hình 3) cho thấy, mẫu protein xử lý bằng dung dịch nạp mẫu có DTT cho vạch protein đúng với kích thước 16 kDa của protein leptin, trong khi mẫu xử lý bằng dung dịch nạp mẫu không có DTT cho vạch protein thấp hơn so với vạch protein của mẫu có xử lý DTT. Sự chênh lệch vạch protein ở hai cách xử lý mẫu có thể do sự hình thành cầu nối disulfide nội phân tử trong mẫu protein leptin sau tái gấp cuộn. Khi không xử lý với DTT, cầu nối disulfide nội phân tử vẫn còn và làm cấu hình của phân tử gọn hơn dạng phân tử đã duỗi thẳng (có xử lý DTT). Như vậy, bằng phương pháp pha loãng và phương pháp thâm tích chúng tôi có thể đã tái gấp cuộn được protein leptin tái tổ hợp từ thể vùi thu được.



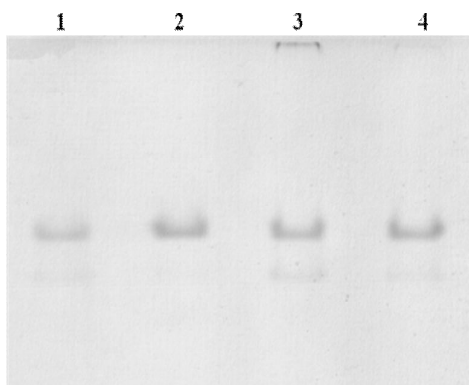
Hình 3. Kiểm tra khả năng hiện diện của cầu nối disulfide trong protein leptin sau tái gấp cuộn

A. Protein leptin trước tái gấp cuộn. B. Protein leptin sau tái gấp cuộn; M. Thang protein khối lượng phân tử thấp; N: không khử cầu nối disulfide; R: có khử cầu nối disulfide.

Nhằm xác nhận cấu hình của protein sau tái gấp cuộn, chúng tôi tiến hành điện di Native-PAGE protein sau tái gấp cuộn. Đây là kỹ thuật điện di trên gel polyacrylamide không có tác nhân biến tính, vì vậy, phân tử protein chạy trong gel sẽ phân tách dựa vào điện tích bề mặt

của phân tử, các phân tử có cấu hình giống nhau sẽ có bề mặt tích điện giống nhau, tức là vạch protein trên gel điện di sẽ ngang bằng và giống nhau. Khi điện di Native-PAGE và so sánh với leptin chuẩn (R&D Systems, Hoa Kỳ), chúng tôi nhận thấy sản phẩm tái gấp cuộn từ phương

pháp thẩm tích và phương pháp pha loãng đều có cấu hình đúng như leptin chuẩn (hình 4).

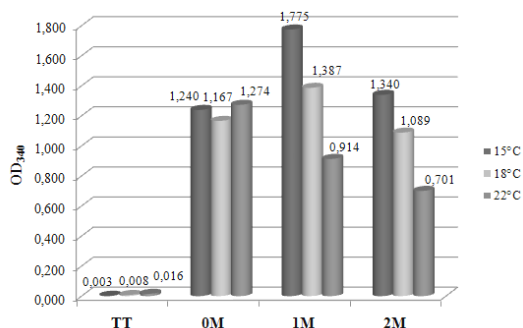


Hình 4. Kiểm tra cấu hình tự nhiên của protein leptin sau tái gấp cuộn bằng điện di Native-PAGE

1. Leptin chuẩn (R&D Systems); 2. protein leptin tái gấp cuộn bằng phương pháp thẩm tích; 3. protein leptin tái gấp cuộn bằng phương pháp pha loãng không có urea; 4. protein leptin tái gấp cuộn bằng phương pháp pha loãng có urea 2 M.

Đánh giá hiệu quả tái gấp cuộn

Phân tích sự kết cụm protein của các sản phẩm tái gấp cuộn thông qua giá trị OD₃₄₀ (hình 5), chúng tôi thấy khi tái gấp cuộn bằng



Hình 5. Mức độ kết cụm protein của các sản phẩm tái gấp cuộn

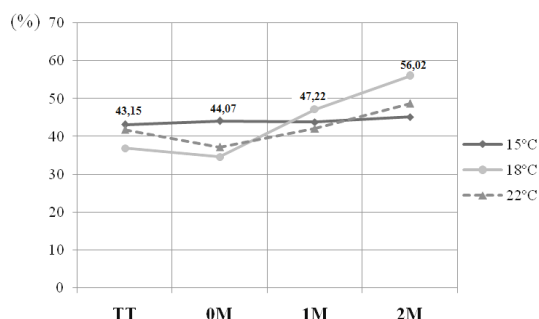
TT. Tái gấp cuộn bằng phương pháp thẩm tích; OM, 1M, 2M. Tái gấp cuộn bằng phương pháp pha loãng không có urea, urea 1 M, urea 2 M.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tái gấp cuộn thành công protein leptin người tái tổ hợp trong thể vùi thu

phương pháp thẩm tích mức độ kết cụm rất ít ($OD_{340} < 0,020$), trong khi đó, các mẫu tái gấp cuộn bằng phương pháp pha loãng đều có mức độ kết cụm khá cao ($0,700 < OD_{340} > 1,387$, thậm chí có một mẫu đạt $OD_{340} = 1,775$). So sánh mức độ kết cụm của các mẫu tái gấp cuộn bằng phương pháp pha loãng trong cùng nhiệt độ cho thấy, các mẫu tái gấp cuộn bằng dung dịch có urea 2M đều có mức độ kết cụm ít hơn các mẫu tái gấp cuộn bằng dung dịch urea nồng độ thấp hơn. Tái gấp cuộn trong dung dịch có nồng độ urea 2M, ở 22°C có mức độ kết cụm protein thấp hơn các mẫu tái gấp cuộn ở 15°C và 18°C, tuy nhiên, sự khác biệt này không quá lớn.

Hiệu suất thu hồi protein được tính toán dựa vào lượng protein trước và sau quá trình tái gấp cuộn. Phương pháp thẩm tích có hiệu suất thu hồi cao nhất 43,15% khi tái gấp cuộn ở 15°C, phương pháp pha loãng có hiệu suất thu hồi cao nhất 56,02% khi tái gấp cuộn ở 18°C (hình 6). Hiệu suất tái gấp cuộn leptin của chúng tôi đạt được tương tự kết quả của các nhóm nghiên cứu khác như Lee & Jeong (1999) [2] là 41,1% với phương pháp sắc ký, Singh et al. (2012) [7] là 60% với phương pháp pha loãng, Zang et al. (2008) [12] là 46,1% với phương pháp pha loãng kết hợp sắc ký.



Hình 6. Hiệu suất thu hồi protein theo khối lượng của các phản ứng tái gấp cuộn leptin

TT. Tái gấp cuộn bằng phương pháp thẩm tích; OM, 1M, 2M. Tái gấp cuộn bằng phương pháp pha loãng không có urea, urea 1 M, urea 2 M.

nhận từ vi khuẩn *E. coli*. Đã xác định được các thông số cơ bản cho quá trình tái gấp cuộn như: dung dịch hòa tan thể vùi leptin (urea 2M,

pH 12,5); tỷ lệ hòa tan 40 mg thể vùi tươi trong 1 ml dung dịch hòa tan; tái gấp cuộn với dung dịch urea 2 M, sucrose 10%, cysteine 5 mM, cystine 0,5 mM, pH 8,5 bằng phương pháp thẩm tích ở 15°C hoặc bằng phương pháp pha loãng ở 18°C.

Phương pháp thẩm tích tuy có hiệu suất thu hồi thấp hơn phương pháp pha loãng (43,15% so với 56,02%) nhưng sản phẩm tái gấp cuộn có mức độ kết cụm rất thấp ($OD_{340}=0,003$), đây là phương pháp tái gấp cuộn phù hợp cho các nghiên cứu ở quy mô phòng thí nghiệm. Trong khi đó, phương pháp pha loãng có mức độ kết cụm protein khá cao ($OD_{340}=1,089$) nhưng trong sản phẩm tái gấp cuộn vẫn chứa phần lớn phân tử protein leptin có cấu hình đúng, hiệu suất thu hồi đạt được của sản phẩm khá cao, đây cũng là phương pháp đơn giản, dễ mở rộng quy mô, thuận lợi cho việc nghiên cứu sản xuất leptin ở quy mô công nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Friedman J. M., 2002. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr. Rev.*, 60(10): 1-14.
- Jeong K. J., Lee S. Y., 1999. High-level production of human leptin by fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* and Its purification. *App. Environ. Microbiol.*, 65(7): 3027-3032.
- Kline, Allen D., Becker, Gerald W., Churgay, Lisa M., Landen, Bryan E., Martin, Debra K., Muth William L., Hale John E., 1997. Leptin is a four-helix bundle: secondary structure by NMR. *FEBS Letters*, 407(2): 239-242.
- Leibel R. L., 2002. The role of leptin in the control of body weight. *Nutr. Rev.*, 60(10): 15-9.
- Peternel S., Grdadolnik J., Gaberc-Porekar V., Komel R., 2008. Engineering inclusion bodies for non denaturing extraction of functional proteins. *Microbial Cell Factories*, 7: 34.
- Sadaf S., Bashir S., Akhtar M. W., 2012. Enhanced production and refolding of human leptin expressed in *Escherichia coli*. *Pak. J. Biochem. Mol. Biol.*, 45(1): 15-19.
- Singh M. S., Panda A. K., 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.*, 99(4): 303-310.
- Vallejo, Felipe L., Rinas, Ursula, 2004. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *BioMed Central*.
- Villaverde A., Mar C. M., 2003. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol. Lett.*, 25(17): 1385-1395.
- Xuan L. M. H, To L. D, Thao D. T. P, Thuoc T. L, 2013. Tạo dòng và biểu hiện protein leptin người tái tổ hợp trong *Escherichia coli*. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ, ĐHQG tp. Hồ Chí Minh*, 18(1): 5-12.
- Wang C., Wang L., Geng X., 2008. High recovery refolding of rhG-CSF from *Escherichia coli*, using urea gradient size exclusion chromatography. *Biotechnol. Progr.*, 24(1): 209-213.
- Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J. M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505): 425-432.
- <http://viendinhduong.vn/news/vi/160/62/a/ket-qua-dieu-tra-thua-can---beo-phi-va-mot-so-yeu-to-lien-quan-o-nguoi-viet-nam-25--64-tuoi.aspx>.

**A STUDY ON REFOLDING RECOMBINANT HUMAN LEPTIN PROTEIN
FROM *Escherichia coli* INCLUSION BODY**

Le Mai Huong Xuan, Dang Thi Phuong Thao, Tran Linh Thuoc

University of Science, VNU-HCM

SUMMARY

Leptin, a peptide hormone, is produced by mature adipocytes and functions primarily in the hypothalamus in regulating food intake and body metabolism. We have studied the production of recombinant human leptin in the bacterial system *Escherichia coli* for generating high-quality materials for the study on development of body weight regulation products in human. It was found that high-level expression of recombinant leptin protein in *E. coli* led to the formation of inclusion bodies. Therefore, solubilization and refolding leptin in inclusion bodies are crucial for the production of recombinant leptin from *E. coli*. Our results showed that leptin inclusion bodies can be solubilized by low concentration of denaturant, 2 M urea solution pH 12.5. Then, the protein was refolded by using dilution method or dialysis method. The native form of proteins has been confirmed by SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions, Native-PAGE, agglutination absorption at OD₃₄₀; and the concentration was also determined by Bradford method. The recovery efficiency of dilution method was 56.02% and that of dialysis method was 43.15%. Our results provide necessary data for further study on development of recombinant leptin products.

Keywords: *Escherichia coli*, Agglutination, inclusion body, leptin, refolding, solubilization.

Ngày nhận bài: 15-7-2013