

DOI:10.22144/ctu.jvn.2020.030

## TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN INTERLEUKIN 2 (IL-2) NGƯỜI TÁI TỔ HỢP TRONG *Escherichia coli*

Ngô Thị Kim Hằng, Nguyễn Phan Viễn Phương, Trần Nguyễn Thảo Sương và Trần Văn Hiếu\*

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Văn Hiếu (email: tvhieu@hcmus.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 14/11/2019

Ngày nhận bài sửa: 10/02/2020

Ngày duyệt đăng: 29/04/2020

### Title:

Cloning and expressing human recombinant interleukin 2 (IL-2) in *Escherichia coli*

### Từ khóa:

*E. coli*, Interleukin 2, Origami, thể vùi

### Keywords:

*E. coli*, Interleukin 2, inclusion bodies, Origami

### ABSTRACT

Immunotherapy using interleukin 2 (IL-2) was approved by FDA for the treatment of some solid tumors and for the combination with AIDS/HIV's HAART. In order to produce recombinant interleukin 2 with low price, the project was initiated to clone and express IL-2 in *Escherichia coli*. The *il2* gene was amplified by PCR, using the pIDT-IL2 as template with two specific primers (IL2-F and IL2-R) containing BamHI and NdeI sites. The PCR product was digested with BamHI and NdeI then inserted into an expression vector pET-His to construct a recombinant plasmid termed pET-il2 capable of expressing IL-2 under the control of T7 promoter. The recombinant plasmid pET-il2 was transformed into *E. coli* strain Origami(DE3) to form the Origami(DE3)/pET-il2 clone. This clone was cultured and induced with 0.5 mM IPTG over-expressed IL-2 protein as inclusion body in cytoplasm. The expressing of the target protein was confirmed by SDS-PAGE and Western Blot with anti-IL2 antibody.

### TÓM TẮT

Liệu pháp miễn dịch sử dụng interleukin 2 (IL-2) đã được FDA chấp thuận sử dụng cho việc điều trị một số bệnh ung thư và hỗ trợ điều trị HIV/AIDS. Nhằm mục tiêu sản xuất IL-2 tái tổ hợp với giá thành rẻ, để tài được triển khai nhằm dòng hóa và biểu hiện IL-2 trong *Escherichia coli*. Gen *il2* được khuếch đại bằng phương pháp PCR sử dụng khuôn là plasmid pIDT-IL2 với cặp môi đặc hiệu IL2-F và IL2-R chứa vị trí nhận biết của enzyme BamHI và NdeI. Sản phẩm khuếch đại được xử lý với enzyme BamHI và NdeI và chèn vào vector biểu hiện pET-His tạo nên plasmid tái tổ hợp pET-il2. Plasmid pET-il2 được biến nạp vào *E. coli* Origami(DE3) tạo nên dòng tái tổ hợp Origami(DE3)/pET-il2. Dòng tế bào này khi được cảm ứng biểu hiện bằng 0,5 mM IPTG đã tạo protein IL-2 biểu hiện vượt mức ở dạng thể vùi trong tế bào chất. Sự biểu hiện protein mục tiêu được kiểm chứng bằng SDS-PAGE và lai Western với kháng thể kháng protein IL-2.

Trích dẫn: Ngô Thị Kim Hằng, Nguyễn Phan Viễn Phương, Trần Nguyễn Thảo Sương và Trần Văn Hiếu, 2020. Tạo dòng và biểu hiện interleukin 2 (IL-2) người tái tổ hợp trong *Escherichia coli*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(2B): 53-58.

### 1 MỞ ĐẦU

Ngày nay, sự phát triển của y học tuy đã đạt được nhiều thành tựu to lớn nhưng ung thư vẫn là vấn đề

y tế lớn đối với nhân loại và đồng thời cũng là thách thức đối với y học. Mỗi năm thế giới có thêm khoảng 12,7 triệu trường hợp ung thư mắc mới được phát

hiện và 7,6 triệu bệnh nhân tử vong do ung thư (Globocan, 2018a). Trong đó, riêng tại Việt Nam hàng năm có khoảng 150.000 - 200.000 người mắc bệnh ung thư mới và có khoảng 75.000 - 100.000 người tử vong vì bệnh này (Globocan, 2018b). Gần đây, liệu pháp miễn dịch được khẳng định là một phương pháp mới có hiệu quả trong điều trị ung thư khi được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp với các phương pháp phẫu thuật, hóa trị và xạ trị. Liệu pháp miễn dịch điều trị ung thư dựa trên cơ sở sử dụng các tác nhân có tác dụng tăng cường đáp ứng miễn dịch của cơ thể chống lại khối u, ức chế các nhân tố làm suy giảm miễn dịch đi kèm với bệnh ung thư và làm tăng cường tính kháng nguyên của tế bào ung thư (Rosenberg, SA., 2014; Jaing, Y, *et al.*, 2016). Phương pháp này có những ưu điểm đáng chú ý so với các phương pháp cũ như điều trị hiệu quả trong trường hợp ung thư di căn mà các phương pháp cục bộ như phẫu thuật và xạ trị điều trị không hiệu quả và không gây ra tác dụng phụ như rụng tóc, suy giảm miễn dịch, viêm loét dạ dày đi kèm với liệu pháp hóa trị.

Interleukin-2 (IL-2) là một cytokine với tác dụng điều hòa và tăng cường khả năng miễn dịch, là nhân tố nhân dòng và tăng cường hoạt tính gây độc tế bào của tế bào lympho T hoạt hóa, tế bào giết tự nhiên (NK), tăng cường khả năng thực bào của bạch cầu đơn nhân, kích thích sự tổng hợp kháng thể của tế bào B và tổng hợp các cytokine thứ cấp khác như TNF (Tumor Necrosis Factor), INF- $\gamma$ ... Với những đặc điểm đó, liệu pháp miễn dịch sử dụng IL-2 đã và đang được quan tâm nghiên cứu, phát triển. Liệu pháp sử dụng sản phẩm IL-2 tái tổ hợp Proleukin (Cetus corporation) và Teceleukin (Hoffmann-La Roche) cho kết quả điều trị khả quan đối với một số dạng bệnh ung thư trên các thử nghiệm lâm sàng và đã được FDA cho phép sử dụng điều trị u hắc tố ác tính và ung thư biểu mô thận di căn, đồng thời có tác dụng làm tăng số lượng tế bào T CD4<sup>+</sup> khi kết hợp với liệu pháp kháng retrovirus hoạt tính cao trong điều trị HIV/AIDS (Gaffen and Liu, 2004).

Về cấu trúc, IL-2 là một glycoprotein dạng tiết, đơn phân, trọng lượng phân tử của IL-2 nằm trong khoảng từ 15-18 kDa. Sự khác biệt về trọng lượng của IL-2 là do mức độ glycosyl hóa khác nhau sau dịch mã. Cho đến nay, vai trò của sự glycosyl hóa vẫn chưa được biết rõ, tuy nhiên nhiều nghiên cứu cho thấy sự glycosyl hóa không cần thiết cho chức năng sinh học của cytokine này (Gaffen and Liu, 2004), đây là một đặc điểm thuận lợi cho phép sử dụng hệ thống biểu hiện prokaryote sản xuất IL-2 tái tổ hợp.

Hiện nay có rất nhiều chủng *E. coli* dùng để biểu hiện protein tái tổ hợp đã được phát triển và thương mại hóa, trong đó *E. coli* Origami(DE3) là dạng chủng chủ phổ biến được dùng trong biểu hiện protein tái tổ hợp có cấu trúc cầu disulfide trong phân tử. Chủng này mang đột biến khuyết protease *Omp* và *Lon* giúp hạn chế sự thủy phân protein mục tiêu, đột biến cả hai gen mã hóa cho thioredoxin reductase (*trxB*) và glutathione reductase (*gor*) tăng cường khả năng hình thành cầu nối disulfide trong tế bào chất, có sức sống và khả năng biểu hiện mạnh (Terpe, 2006). *E. coli* Origami(DE3) thích hợp với vector biểu hiện thuộc hệ thống pET cho phép biểu hiện vượt mức protein mục tiêu và hạn chế tối đa sự rò rỉ phiên mã khi không có mặt chất cảm ứng.

Xuất phát từ những kết quả điều trị khả quan đối với đã một số dạng bệnh ung thư, hỗ trợ điều trị HIV/AIDS đã được chứng minh qua các thử nghiệm lâm sàng và tiềm năng ứng dụng IL-2 tái tổ hợp trong điều trị ở Việt Nam cũng như những ưu điểm nổi bật của hệ thống biểu hiện *E. coli*, đề tài “Tạo dòng và biểu hiện protein Interleukin-2 tái tổ hợp trong tế bào *E. coli* Origami(DE3)” được tiến hành như là bước đầu trong việc xây dựng quy trình sản xuất IL-2 cho các ứng dụng thử nghiệm điều trị.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1 Chủng vi sinh vật, plasmid và môi

Chủng chủ *E. coli* DH5 $\alpha$  [F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>), *phoA*, *supE44*,  $\lambda$ , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*] được dùng để dòng hóa các gen (Takara). Chủng *Escherichia coli* Origami(DE3) [ $\Delta$ ara-leu7697,  $\Delta$ lacX74,  $\Delta$ phoAPvuII, *phoR*, *araD139*, *ahpC*, *galE*, *galK*, *rpsL*, F'[lac+(lacIq)pro], *gor522::Tn10* (TcR)*trxB::kan* (DE3)] dùng để biểu hiện protein.

Plasmid pIDT-IL2 mang đoạn gen *il2* tối ưu hóa cho việc biểu hiện ở *E. coli* tổng hợp bởi IDTDNA được dùng làm khuôn trong PCR thu nhận gen *il2*. pET-His (Novagen) là vector biểu hiện ở *E. coli* có kích thước khoảng 4636 bp, mang gen kháng ampicilin và promoter T7 cho phép biểu hiện protein mục tiêu trong tế bào chất *E. coli*.

### 2.2 Cấu trúc chủng *E. coli* DH5 $\alpha$ mang plasmid tái tổ hợp pET-*il2*

Quy trình tạo dòng *E. coli* DH5 $\alpha$  mang plasmid tái tổ hợp pET-*il2* được thực hiện như sau: thu nhận gen *il2* mã hóa protein interleukin 2 bằng phương pháp PCR từ khuôn là plasmid pIDT-IL2 sử dụng cặp môi đặc hiệu IL2-F: CATATGCCAACGTCCTCAAGC và IL2-R:

**GGATCCCTACGTCAGCGTTGAAATG.**

Chương trình chạy PCR: 95°C/5'; 30 chu kỳ: 94°C/45", 55°C/45", 72°C/45"; kết thúc: 72°C/10'. Sản phẩm PCR được xử lý với enzyme *Bam*HI và *Nde*I để tạo đầu dính; thực hiện phản ứng nối gen *il2* vào pET-His đã được cắt mở vòng bằng 2 enzyme tương ứng để hình thành plasmid tái tổ hợp pET-*il2*. Plasmid pET-*il2* được biến nạp vào *E. coli* DH5α bằng phương pháp biến nạp calcium lạnh (Sambrook, J.F., *et al.*, 2001). Dòng tế bào *E. coli* DH5α mang plasmid tái tổ hợp pET-*il2* (*E. coli* DH5α/pET-*il2*) được sàng lọc trên môi trường LB agar chứa ampicillin nồng độ cuối là 100 µg/ml (LB-Amp100) và kiểm tra dòng mục tiêu bằng PCR khuẩn lạc với cặp môi T7 promoter và T7 terminator. Chương trình chạy PCR: 95°C/5'; 30 chu kỳ: 94°C/45", 50°C/45", 72°C/45"; kết thúc: 72°C/10'. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel 1% agarose. Các thể biến nạp có kết quả PCR dương tính (kích thước 627bp) được tách chiết plasmid bằng phương pháp SDS kiềm (Sambrook and Russell, 2001). Plasmid sau khi thu nhận được kiểm tra bằng PCR plasmid (sử dụng cặp môi đặc hiệu cho gen IL2-F - IL2-R và cặp môi nằm trên plasmid là T7 promoter - T7 terminator). Những plasmid dương tính được giải trình tự với kit BigDye™ Terminator (Macrogen Inc., Hàn Quốc). Kết quả giải trình tự được so sánh độ tương đồng với trình tự lý thuyết bằng phần mềm Jellyfish.

Plasmid tái tổ hợp pET-*il2* sau khi xác định trình tự được biến nạp vào *E. coli* Origami(DE3). Dòng tế bào *E. coli* Origami(DE3) mang plasmid tái tổ hợp pET-*il2* (*E. coli* Origami(DE3)/pET-*il2*) được sàng lọc trên môi trường LB-Amp100. Những khuẩn lạc nào mọc được trên môi trường này sẽ được lựa chọn để cảm ứng với IPTG để kiểm tra sự biểu hiện protein mục tiêu.

### 2.3 Xác định khả năng biểu hiện protein Interleukin-2 (IL-2) của chủng *E. coli* Origami(DE3)/pET-*il2*

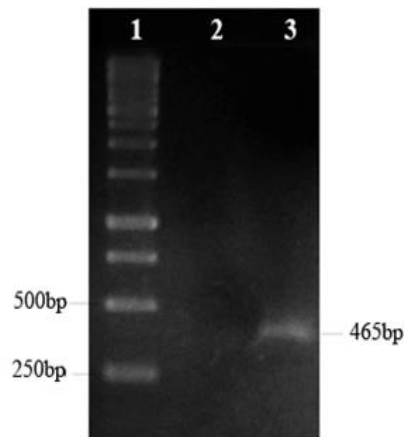
*E. coli* Origami(DE3) chứa pET-*il2* (*E. coli* Origami(DE3)/pET-*il2*) được cảm ứng biểu hiện protein Interleukine-2 (IL-2) theo sự hướng dẫn của công ty Novagen. Nuôi *E. coli* Origami(DE3)/pET-*il2* bằng LB-Amp100, lắc 250 vòng/phút, 37°C đến khi OD<sub>600</sub> đạt 0,8 – 1,0; bổ sung IPTG đạt 0,5 mM để cảm ứng sự biểu hiện IL-2, tiếp tục nuôi lắc thêm 16 giờ. Thu và rửa sinh khối tế bào, huyền phù tế bào trong đệm lạnh (Tris-HCl 10mM, pH7, 1mM EDTA), đặt trong đá 15 phút, phá tế bào bằng Ultrasonic Cell Disruptor (Mỹ), ly tâm 13.000 vòng/phút, 4°C, 10 phút, thu phân đoạn tan (dịch

nôi) và không tan (thể vùi). Tổng protein được chuẩn bị bằng cách thêm dung dịch nạp mẫu, đun cách thủy 5 phút, ly tâm 13.000 vòng/phút, 4°C, 15 phút, sử dụng phân dịch nổi để phân tích protein tổng.

Sự biểu hiện IL-2 được phân tích bằng SDS-PAGE 15% theo sự mô tả của Laemmli (1970) (Laemmli, 1970) và khẳng định lại bằng lai Western sử dụng kháng thể đặc hiệu kháng IL-2 (*Abcam*) và phát hiện nhờ kháng thể kháng kháng thể dê IgG-HRP (*Abcam*). Phần trăm biểu hiện của IL-2 được xác định bằng phần mềm Quantity-One (BioRad), khối lượng phân tử IL-2 được so với thang phân tử lượng thấp (Amersham).

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Cấu trúc chủng *E. coli* DH5α mang plasmid tái tổ hợp pET-*il2*



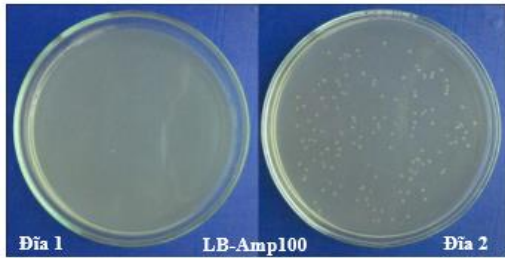
**Hình 1: Kết quả PCR thu gen *il2***

Giếng 1, Thang chuẩn DNA 1kbp plus (*Fermentas*)

Giếng 2, Chứng âm (dung dịch phản ứng PCR không có bản mẫu pIDT-*il2*)

Giếng 3, Sản phẩm PCR với môi IL-2F và IL-2R với bản mẫu pIDT-*il2*

Gen *il2* được thu nhận bằng phương pháp PCR với khuôn pIDT-*IL2* sử dụng cặp môi đặc hiệu IL2-F và IL2-R. Sản phẩm PCR có kích thước dự kiến là 465bp (Hình 1, giếng 3). Gen *il2* sau đó được xử lý với enzyme *Bam*H I và *Nde* I, nối vào vector pET-His đã được cắt mở vòng bằng các enzyme tương ứng tạo plasmid tái tổ hợp pET-*il2*. Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5α bằng phương pháp hóa biến nạp. Yếu tố chọn lọc được sử dụng là khả năng kháng kháng sinh ampicillin. Kết quả biến nạp được trình bày trong Hình 2.

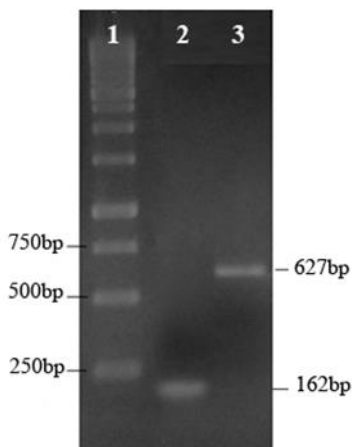


**Hình 2: Kết quả biến nạp sản phẩm nổi vào chủng E. coli DH5α**

Đĩa 1, E. coli DH5α không biến nạp sản phẩm nổi

Đĩa 2, E. coli DH5α được biến nạp sản phẩm nổi

Chỉ những thể biến nạp nào nhận plasmid pET-His mới có khả năng kháng ampicilin và hình thành khuẩn lạc trên môi trường có chứa kháng sinh này (Hình 2, đĩa 2). Các thể biến nạp này sẽ được kiểm tra bằng phương pháp PCR khuẩn lạc để tuyển chọn dòng mang plasmid mục tiêu. Kết quả ở Hình 3 cho thấy sản phẩm PCR khuẩn lạc của thể biến nạp bằng cặp mồi T7 promoter và T7 terminator cho 1 vạch nằm ở khoảng giữa vạch 600 bp và 700 bp của thang chuẩn, phù hợp với kích thước dự đoán là 627 bp (giếng 3, Hình 3). Đây là kích thước của gen *il2* (627bp) và 1 phần trình tự giữa hai mồi trên vector. Trong khi đó, sản phẩm PCR sử dụng plasmid pET-His làm khuôn chỉ cho 1 vạch có kích thước 162 bp (giếng 2, Hình 3).



**Hình 3: Kết quả PCR khuẩn lạc**

Giếng 1, Thang chuẩn DNA 1kbp plus (Fermentas)

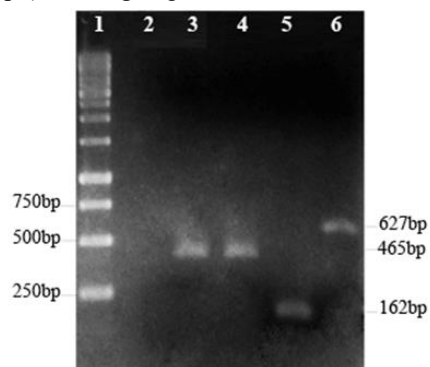
Giếng 2, Sản phẩm PCR plasmid pET-His

Giếng 3, Sản phẩm PCR khuẩn lạc dự tuyển

Những khuẩn lạc có kết quả PCR dương tính sẽ được tiếp tục tách chiết plasmid và kiểm tra lại để khẳng định sự hiện diện của gen *il2* bằng cách sử dụng hai cặp mồi: cặp mồi đặc hiệu cho gen *il2* (IL2-

F và IL2-R) và cặp mồi nằm trên plasmid (T7 promoter và T7 terminator). Kết quả kiểm tra được trình bày trong Hình 4.

Sản phẩm PCR của pET-*il2* (Hình 4, giếng 4) với cặp mồi đặc hiệu (IL2-F và IL2-R) có kích thước khoảng 500 bp, tương ứng với kích thước gen *il2* (465bp – giếng 3). Bên cạnh đó, sản phẩm PCR plasmid tái tổ hợp với cặp mồi T7 promoter và T7 terminator có kích thước khoảng 627 bp tương ứng với gen *il2* (465 bp) cộng 1 phần trình tự giữa hai mồi trên vector (Hình 4, giếng 6). Trong khi đó, sản phẩm PCR pET-His (không mang gen *il2*) bằng cặp mồi T7 promoter và T7 terminator có kích thước 162 bp (Hình 4, giếng 5).



**Hình 4: Kết quả PCR kiểm tra plasmid tái tổ hợp**

Giếng 1, Thang chuẩn DNA 1kbp plus (Fermentas)

Giếng 2, Sản phẩm PCR plasmid pET-His với mồi IL2-F và IL2-R

Giếng 3, Gen *il2*

Giếng 4, Sản phẩm PCR plasmid pET-*il2* với mồi IL2-F và IL2-R

Giếng 5, Sản phẩm PCR plasmid pET-His với mồi T7 promoter và T7 terminator

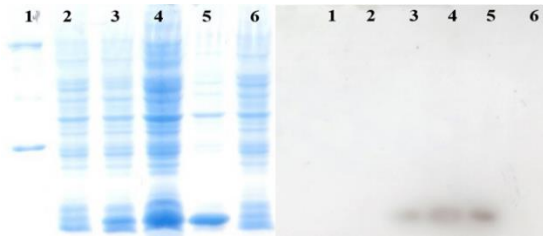
Giếng 6, Sản phẩm PCR plasmid pET-*il2* với mồi T7 promoter và T7 terminator

Plasmid pET-*il2* chứa gen mục tiêu *il2* được giải trình tự để kiểm tra độ chính xác về trình tự cũng như sự đồng khung dịch mã. Trình tự nhận được có độ tương đồng 100% và đồng khung dịch mã với trình tự lý thuyết (Dữ liệu không trình bày).

### 3.2 Xác định khả năng biểu hiện protein Interleukin-2 (IL-2)

Nhằm đánh giá sự biểu hiện và tìm hiểu đặc tính hiện diện của IL-2 ở dạng thể vùi hay hòa tan trong tế bào chất, chúng ta sử dụng *E. coli* Origami(DE3)/pET-*il2* được nuôi cấy lắc trong LB-Amp100 và cảm ứng bằng IPTG. Sinh khối tế bào được thu nhận sau 16 giờ cảm ứng và chuẩn bị mẫu protein tổng số, phân

đoạn tan (chứa IL-2 dạng tan) và phân đoạn không tan (chứa IL-2 dạng thể vùi). Sự hiện diện của IL-2 trong các phân đoạn tổng, phân đoạn tan và phân đoạn không tan được phân tích bằng SDS-PAGE và lai Western như mô tả ở Hình 5.



**Hình 5: Kết quả điện di SDS-PAGE (A) và lai Western Blot với kháng thể kháng IL-2 (B)**

Giếng 1, Thang protein phân tử lượng thấp

Giếng 2, *E. coli* Origami(DE3) được cảm ứng IPTG

Giếng 3, *E. coli* Origami(DE3)/pET-il2 không cảm ứng IPTG

Giếng 4, *E. coli* Origami(DE3)/pET-il2 cảm ứng IPTG, mẫu protein tổng

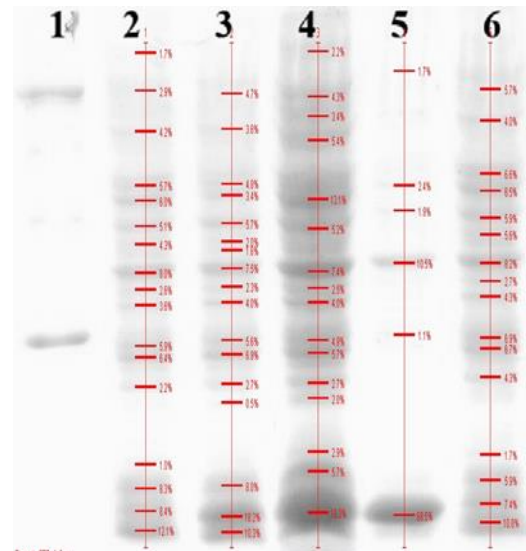
Giếng 5, *E. coli* Origami(DE3)/pET-il2 cảm ứng IPTG, mẫu protein dạng thể vùi

Giếng 6, *E. coli* Origami(DE3)/pET-il2 cảm ứng IPTG, mẫu protein dạng tan

Kết quả phân tích SDS-PAGE cho thấy khi được cảm ứng bởi IPTG, chủng tái tổ hợp đã tổng hợp một lượng lớn protein có kích thước khoảng 16 kDa (Hình 5A, giếng 4), trong khi đó vạch protein này không hiện diện trong dịch tổng khi chủng Origami(DE3) được cảm ứng IPTG (Hình 5A, giếng 1). So sánh với khối lượng phân tử lý thuyết của IL-2 khoảng 16 kDa cho thấy vạch protein hiện diện trong dịch tổng được cảm ứng có thể là IL-2 tái tổ hợp biểu hiện từ pET-il2. Nhằm khẳng định vạch protein được biểu hiện là IL-2, SDS-PAGE được phân tích thêm bằng lai Western với kháng thể đặc hiệu kháng IL-2, trên bản phim xuất hiện vạch tín hiệu tương ứng với vị trí của vạch protein xuất hiện trong dịch tổng protein khi được cảm ứng IPTG (Hình 5B, giếng 4), kết quả này khẳng định vạch protein đậm xuất hiện khi được cảm ứng chính là IL-2. Đồng thời, kết quả phân tích điện di SDS-PAGE và lai Western cũng cho thấy chủng Origami(DE3)/pET-il2 khi không được cảm ứng bằng IPTG cũng tạo ra một lượng nhỏ protein mục tiêu (giếng 3, Hình 5A và 5B).

Phân tích đặc tính hiện diện của IL-2 trong *E. coli* Origami(DE3)/pET-il2 ở phân đoạn protein không tan và tan (Hình 5B, giếng 4 và 5) cho thấy IL-2 biểu hiện và tồn tại ở dạng thể vùi. Định lượng bằng phần mềm Quantity-One cho thấy IL-2 biểu

hiện chiếm 19,3% tổng protein của tế bào *E. coli* Origami(DE3)/pET-il2 (Hình 6, giếng 4) và chiếm 68,5% tổng lượng protein được biểu hiện ở dạng thể vùi (Hình 6, giếng 5).



**Hình 6: Kết quả định lượng sự biểu hiện IL-2 bằng phần mềm Quantity-One**

Giếng 1, Thang protein phân tử lượng thấp

Giếng 2, *E. coli* Origami(DE3) được cảm ứng IPTG

Giếng 3, *E. coli* Origami(DE3)/pET-il2 không cảm ứng IPTG

Giếng 4, *E. coli* Origami(DE3)/pET-il2 cảm ứng IPTG, mẫu protein tổng

Giếng 5, *E. coli* Origami(DE3)/pET-il2 cảm ứng IPTG, mẫu protein dạng thể vùi

Giếng 6, *E. coli* Origami(DE3)/pET-il2 cảm ứng IPTG, mẫu protein dạng tan

Những kết quả trên chứng tỏ đề tài đã thành công trong việc tạo chủng *E. coli* Origami(DE3)/pET-il2 biểu hiện vượt mức IL-2 người tái tổ hợp.

#### 4 KẾT LUẬN

Chủng *E. coli* Origami(DE3)/pET-il2 đã được cấu trúc thành công và biểu hiện protein mục tiêu IL-2 dạng thể vùi trong tế bào chất với phần trăm biểu hiện được tính toán bằng phần mềm Quantity One (BioRad) là 19,3% so với lượng protein tổng. Mặc dù vẫn còn một lượng nhỏ protein mục tiêu bị rò rỉ khi chủng Origami(DE3)/pET-il2 không được cảm ứng bằng IPTG chứng tỏ promoter được kiểm soát chưa được chặt chẽ. Tuy nhiên, lượng protein này không đáng kể so với lượng IL-2 được tạo ra khi chủng cảm ứng bởi IPTG. Điều này chứng tỏ việc cảm ứng chủng Origami(DE3)/pET-il2 bằng IPTG cho hiệu quả biểu hiện đáng kể và thu nhận được

một lượng protein chiếm đến 68,5% lượng protein được biểu hiện ở dạng thể vùi.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Gaffen, S.L. and Liu, K.D., 2004. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*. 28(3): 109-23.

Terpe, K., 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72(2): 211-222.

Sambrook, J.F. and Russell, D.W., 2001. Molecular Cloning, *A laboratory Manual*, Third Edition. Cold Spring Harbor. New York, 2.344 pages.

Globocan, 2018a. International Agency for Research on Cancer, accessed in May 2019. Available from: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>

Globocan, 2018b. International Agency for Research on Cancer, accessed in May 2019. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/704-viet-nam-fact-sheets.pdf>

Rosenberg, S.A., 2014. IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. *The Journal of Immunology*. 192(12): 5451-5458.

Jiang, T., Zhou, C. and Ren, S., 2016. Role of IL-2 in cancer immunotherapy. 5(6): e1163462.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259): 680-685.