

TẠO DÒNG VI KHUẨN *E. coli* MANG GEN RGP MÃ HÓA HORMONE KÍCH THÍCH SINH SẢN HẢI SÂM

Hoàng Đình Chiêu^{1,*}, Lưu Xuân Hoà¹, Bùi Minh Tuấn¹, Nguyễn Thị Tuyết Mai¹,
Nguyễn Kim Thoa¹, Đồng Thị Dung¹, Đỗ Anh Duyệt¹

¹ Viện Nghiên cứu Hải sản

*Email: hoangdinhchieu@gmail.com

TÓM TẮT

Hormone kích thích sinh sản RGP (Relaxin-like Gonad-stimulating Peptide) là một giải pháp tiên tiến, hiệu quả trong sản xuất giống hải sâm. Để sản xuất lượng lớn hormone RGP và có hoạt tính sinh học cao, cần sử dụng công nghệ protein tái tổ hợp thông qua vi khuẩn *E. coli* và nấm men *Pichia pastoris*. Vì vậy, trong nghiên cứu này, vector pPIC9K đã được thiết kế để mang gen RGP (pPIC9K-RGP). Chúng *E. coli* JM109 được cấu trúc để mang plasmid pPIC9K-RGP tái tổ hợp. Quá trình sàng lọc bằng kháng sinh ampicillin sau đó đã giúp thu được dòng khuẩn lạc *E. coli* mang plasmid pPIC9K-RGP tái tổ hợp. Kết quả giải trình tự ADN của plasmid pPIC9K-RGP từ *E. coli* sau sàng lọc kháng sinh cho thấy, gen RGP mã hóa hormone kích thích sinh sản hải sâm đã được cấu trúc trong *E. coli*. Đây là khâu quan trọng tạo nguồn nguyên vật liệu ban đầu để sản xuất hormone RGP tái tổ hợp trên nấm men *P. pastoris* và tiến tới sản xuất hormone này ở quy mô thương mại phục vụ sản xuất giống hải sâm ở Việt Nam.

Từ khóa: *E. coli*, hải sâm, hormone tái tổ hợp, RGP.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hải sâm thuộc ngành động vật da gai (Echinodermata), trên thế giới đã phát hiện được khoảng trên 1.400 loài [1], trong đó nhiều loài có giá trị kinh tế cao, là nguồn dược phẩm và thực phẩm bổ dưỡng. Do hải sâm có giá trị sử dụng cao nên nguồn lợi hải sâm đã và đang bị khai thác quá mức ở nhiều khu vực khác nhau trên thế giới, trong đó có nhiều loài có giá trị kinh tế cao đang bị khai thác cạn kiệt và đứng trước nguy cơ tuyệt chủng [2]. Các nghiên cứu về đặc điểm phân bố của hải sâm ở Việt Nam cho thấy, vùng biển nước ta có khoảng 60 loài hải sâm, trong đó chủ yếu tập trung ở vùng biển tỉnh Phú Yên, Khánh Hòa và các đảo xa bờ như Phú Quốc, Thổ Chu, Trường Sa, Côn Đảo... [3, 4]. Tuy nhiên, nguồn lợi tự nhiên hải sâm đã và đang có chiều hướng suy giảm nhanh chóng do việc khai thác quá mức. Nhiều loài hải sâm có nguy cơ tuyệt chủng hoặc đe dọa bị tuyệt chủng đã được liệt kê trong danh mục các loài thủy sinh quý hiếm có nguy cơ tuyệt chủng ở Việt Nam cần được bảo vệ, phục hồi và phát triển. Kết

quả điều tra nguồn lợi hải sâm năm 2012 [5] cho thấy, thành phần loài hải sâm phân bố ở một số vùng biển Việt Nam trong thời gian khảo sát là rất ít so với các nghiên cứu trong năm 2006 [3]. Như vậy, nguồn lợi hải sâm ở một số vùng biển Việt Nam có sự suy giảm mạnh cả về sản lượng và thành phần loài, đặc biệt là các loài có giá trị kinh tế cao (hải sâm vú *Holothuria fuscogilva*, hải sâm cát *H. scabra*, hải sâm đen *H. leucospilota*). Trong bối cảnh như vậy, sinh sản nhân tạo là một trong những giải pháp hiệu quả nhằm cung cấp nguồn giống thả phục hồi quần đàn tự nhiên, nuôi trồng và bảo tồn nguồn lợi cho loài hải sâm có giá trị kinh tế rất cao này. Các phương pháp kích thích sinh sản nhân tạo hải sâm truyền thống như kích nhiệt, tạo dòng chảy mạnh, sử dụng dung dịch tinh trùng hải sâm thường phải phụ thuộc rất nhiều vào mùa vụ sinh sản và tuyển sinh dục của các cá thể hải sâm bố mẹ phải đạt đến mức độ chín muồi giai đoạn cuối, gây ảnh hưởng đến quần đàn bố mẹ, chưa thực sự hiệu quả. Một phương pháp kích thích sinh sản mới, rất hiệu quả đã được ghi

nhận là phương pháp sử dụng peptide thần kinh được chiết xuất từ chính các dây thần kinh của loài hải sâm [6].

Công nghệ protein tái tổ hợp được ứng dụng chủ yếu trong sản xuất hormone kích dục tố. Từ năm 2009 - 2016, một số nghiên cứu đã tìm ra hợp chất RGP (Relaxin-like Gonad-stimulating Peptide) được nhận định là một dạng hormone kích dục tố ở nhóm sao biển và cũng được ghi nhận là có thể kích thích chín muối noãn bào và kích thích sinh sản ở các loài hải sâm [7 - 9]. Đã có những nghiên cứu về hormone RGP ở hải sâm đen *H. leucospilota* và hải sâm cát *H. scabra* [6], tuy nhiên chưa có nghiên cứu sản xuất hormone RGP ở loài hải sâm đen *H. leucospilota*. Trong công nghệ sản xuất hormone RGP, việc thiết kế vector biểu hiện hormone RGP thông qua vi khuẩn *E. coli* là bước quan trọng, không thể thiếu, tạo nguồn nguyên vật

liệu ban đầu phục vụ cho công tác sản xuất hormone RGP ở các bước tiếp theo.

Bài báo này trình bày một số kết quả nghiên cứu tạo vector biểu hiện hormone RGP thông qua vi khuẩn *E. coli* bao gồm: (1) Đưa đoạn gen RGP vào vector pPIC9K; (2) Biến nạp plasmid pPIC9K-RGP vào tế bào *E. coli*; (3) Sàng lọc các tế bào *E. coli* mang plasmid pPIC9K-RGP trên môi trường LB agar có chọn lọc bằng ampicillin và tạo dòng *E. coli* tái tổ hợp mang plasmid pPIC9K-RGP; (4) Kiểm tra sản phẩm tách chiết plasmid pPIC9K-RGP tái tổ hợp từ *E. coli* bằng PCR và giải trình tự.

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, dụng cụ, hóa chất

Vật liệu, dụng cụ và hóa chất sử dụng cho các thí nghiệm được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Vật liệu, dụng cụ, hóa chất thí nghiệm trong thiết kế vector biểu hiện hormone RGP thông qua vi khuẩn *E. coli*

STT	Nội dung công việc	Vật liệu, dụng cụ, hóa chất
1	- Đưa đoạn gen RGP vào vector pPIC9K	- Gen RGP - Vector pPIC9K
2	- Biến nạp plasmid pPIC9K-RGP vào tế bào <i>E. coli</i>	- pPIC9K-RGP - <i>E. coli</i> JM109 - DNA ligase buffer
3	- Nuôi cấy <i>E. coli</i> trong môi trường đĩa thạch LB có kháng sinh.	- SOC, LB broth - LB agar plate + ampicillin - Ống Eppendorf, đá, que cấy, nước sạch, máy ủ có rung lắc
4	- Sàng lọc các tế bào <i>E. coli</i> mang plasmid pPIC9K-RGP trên đĩa thạch LB có kháng sinh ampicillin bằng PCR kiểm tra đoạn gen RGP	- Hóa chất PCR, master mix, ladder - Máy chạy PCR - Hóa chất làm agarose gel - Máy chạy điện di - Thuốc nhuộm ADN là 6X GelRed - Máy đọc gel
5	- Nuôi cấy <i>E. coli</i> mang plasmid pPIC9K-RGP trong môi trường dung dịch LB có kháng sinh	- Hóa chất tạo dung dịch LB có kháng sinh - Chủng chứa hormone trên đĩa LB - Buồng nuôi có máy lắc, kiểm soát nhiệt độ

6	- Tách chiết plasmid pPIC9K-RGP từ <i>E. coli</i>	- Bộ KIT QIAprep Spin Midiprep - Bộ KIT QIAquick PCR Purification - EcoRI và NotI - Agarose gel - Hóa chất PCR
7	- Kiểm tra chất lượng, bảo quản pPIC9K-RGP ở -20°C	- Agarose gel - Tủ âm

2.2. Phương pháp đưa đoạn gen RGP vào vector pPIC9K

Xuất phát từ trình tự neuropeptide RGP của loài hải sâm cát (*H. scabra*) được công bố [6], tiến hành kiểm tra trình tự neuropeptide RGP của loài hải sâm đen (*H. leucospilota*) bằng chương trình BLAST trên cơ sở dữ liệu hệ phiên mã (transcriptome) của loài hải sâm này do Viện Nghiên cứu Hải sản và Trường Đại học Sunshine Coast (Australia) công bố trên NCBI (Genbank accession No.: PRJNA510690). Cơ sở dữ liệu hệ phiên mã transcriptome này chứa tổng số 19,7 Gbp. Sau khi thiết kế được đoạn gen RGP của loài hải sâm đen, cấu trúc cDNA của gen RGP được đưa vào vector pPIC9K (bởi Công ty Genscript) để tạo ra plasmid pPIC9K-RGP, làm nguyên liệu ban đầu cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.3. Phương pháp biến nạp plasmid pPIC9K-RGP vào tế bào *E. coli*

Chuẩn bị đĩa LB có kháng sinh gồm các bước: Pha dung dịch LB với 25 g bột LB broth granules trong 1 L nước cất deion, trộn và khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong vòng 15 phút, sau đó lưu giữ ở nhiệt độ 4°C. Chuẩn bị dung dịch ampicillin có nồng độ 100 mg/ml, thêm 1 L dung dịch LB vào bình tam giác 2 L, thêm 15 g Bacto agar; khử trùng uớt ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút; để hạ nhiệt độ xuống 50°C trong bể nước; thêm 0,5 ml ampicillin (100 mg/ml) vào dung dịch trong tủ cấy dưới ngọn lửa đèn cồn; đổ dung dịch vào đĩa petri đã khử trùng, để nguội dưới ngọn lửa đèn cồn trong tủ cấy; dùng giấy bạc bọc kín, lưu giữ ở nhiệt độ 4°C, dùng tốt nhất trong 30 ngày.

Biến nạp plasmid pPIC9K-RGP vào tế bào khả biến *E. coli* gồm các bước chính: Ống tuýp chứa chủng vi khuẩn *E. coli* JM109 từ tủ âm sâu được

chuyển ra và làm tan trong đá (15 phút); lấy 40 - 50 µl tế bào khả biến *E. coli* và 5 µl plasmid pPIC9K-RGP vào cùng 1 ống eppendoff, giữ trong đá lạnh 30 phút; gia nhiệt 1 phút ở nhiệt độ 42°C. Thêm 1 ml dung dịch môi trường LB không có kháng sinh và ủ ở nhiệt độ 37°C, 200 vòng/phút, từ 45 - 90 phút; ly tâm 5.000 vòng/phút trong 5 phút; loại bỏ dung dịch ly tâm và lưu giữ tế bào *E. coli* tái tổ hợp trong một thể tích dung dịch LB nhất định.

2.4. Phương pháp nuôi cấy *E. coli* trong môi trường đĩa thạch LB có kháng sinh

Sau khi plasmid pPIC9K-RGP được biến nạp thành công vào *E. coli* JM109, hỗn hợp biến nạp được trải trên môi trường thạch LB bổ sung ampicillin (100 mg/ml), ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C. Tiến hành kiểm tra, quan sát khuẩn lạc sinh trưởng trên đĩa thạch trong ngày hôm sau để đánh giá khả năng phát triển của *E. coli*.

Lưu giữ khuẩn lạc chứa vector pPIC9K-RGP gồm các bước: Trên đĩa môi trường LB agar có bổ sung ampicillin đã nuôi vi khuẩn sau biến nạp qua đêm, lấy một khuẩn lạc phát triển chuyển sang nuôi lỏng trong môi trường LB broth có bổ sung ampicillin và nuôi qua đêm ở nhiệt độ 37°C. Lấy 500 µl dịch nuôi vi khuẩn qua đêm kiểm tra OD 0,2-0,3, trộn đều với 500 µl glycerol 50% trong ống tuýp 2 ml, lưu giữ ống tuýp trong tủ đông -80°C. Tất cả thao tác tiến hành trong tủ cấy vô trùng dưới ngọn lửa đèn cồn.

2.5. Phương pháp sàng lọc các tế bào *E. coli* mang plasmid pPIC9K-RGP

Lấy 5 - 10 khuẩn lạc từ đĩa thạch LB, sau đó ngâm vào dung dịch master mix PCR riêng từng khuẩn lạc, chạy kèm cả đối chứng là plasmid không chứa gen hormone. Phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu là 3'-HleRGP: GGAAGAGAG

TTGAGTAGAGCCA và 5'-HleRGP: GCGCACAAC TTAGCAATGTC dùng để khuếch đại gen RGP ở loài hải sâm đen (*H. leucospilota*). Chu kỳ nhiệt gồm: Bước 1: 95°C trong 5 phút; bước 2: 95°C trong 30 giây; bước 3: 55°C trong 30 giây; bước 4: 72°C trong 30 giây; bước 5: 72°C trong 5 phút; bước 6: duy trì ở nhiệt độ 4°C; từ bước 2 đến bước 4 lặp lại 30 chu kỳ. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%.

2.6. Phương pháp nuôi cấy *E. coli* mang plasmid pPIC9K-RGP trong môi trường dung dịch LB có kháng sinh

Dung dịch vi khuẩn *E. coli* mang plasmid pPIC9K-RGP được cấy vào đĩa thạch LB có ampicillin, sau đó ủ hỗn hợp trong môi trường 37°C qua đêm. Sau 01 ngày, từ một khuẩn lạc *E. coli* phát triển trong đĩa thạch, cấy ½ khuẩn lạc vào đĩa thạch LB chứa ampicillin để nuôi và lưu giữ. ½ khuẩn lạc còn lại cấy vào dung dịch LB chứa ampicillin (500 ml LB thường và 100 µl ampicillin). Nuôi vi khuẩn trong tủ nuôi ở nhiệt độ 37°C (150 vòng/phút) qua đêm. Thu sản phẩm vào ngày hôm sau và tiến hành kiểm tra OD của dung dịch. Khi OD dao động 2 - 3, tiến hành thu sinh khối tế bào *E. coli* chứa plasmid pPIC9K-RGP phục vụ cho quá trình thí nghiệm tiếp theo.

2.7. Phương pháp tách chiết plasmid pPIC9K-RGP từ *E. coli*

Phương pháp tách chiết gồm các bước chính sau: Sử dụng KIT QIAprep Spin Miniprep của

Công ty QIAGEN (Hoa Kỳ) để thu gom và làm sạch pPIC9K-RGP từ dung dịch LB chứa vi khuẩn nêu trên. Cắt giới hạn plasmid bằng enzym EcoRI (NotI hoặc SalI) với thành phần gồm: 139 µl H₂O deion, 20 µl 10x Buffer O, 40 µl ADN (0,5 - 1 µg/µl), 1 µl enzym EcoRI (NotI hoặc SalI); Lấy mẫu ADN và kiểm tra nồng độ (duy trì trong khoảng 0,2 - 0,3 µg/µl), ủ mẫu ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút; ủ ở nhiệt độ 37°C (trên máy Eppendorf ThermoMixer) từ 3 - 4 giờ, chuyển nhiệt độ lên 65°C trong khoảng 15 phút để bất hoạt mẫu; chạy điện di kiểm tra plasmid đã cắt trên gel agarose 1%, đồng thời sản phẩm tách chiết plasmid pPIC9K-RGP từ *E. coli* cũng được giải trình tự để kiểm tra kết quả.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thiết kế và đưa RGP vào vector pPIC9K

Kết quả phân tích trình tự amino axit của peptide thần kinh neuropeptide RGP ở loài hải sâm đen (*H. leucospilota*) được thể hiện trong hình 1A với đầy đủ đoạn peptide tín hiệu (signal peptide), đoạn peptide kích hoạt (mature peptide) và các vị trí cắt (cleavage site). Sau khi tìm ra được trình tự hormone RGP của hải sâm đen, tiến hành xác định trình tự chuỗi A (TRLCGRELSRAIYRICSHG), chuỗi B (SGGIARRCCASGCSSSDIAKLC), vị trí cắt RR, KR trong peptide thần kinh neuropeptide RGP và thiết kế gắn với thể 6xHis Tag. Kết quả trình tự amino acid của RGP đã được thiết kế như hình 1B.

(A)	MASKTIRVVFFAAVCVLLVLEEAASRLCGRELSRAIYRICSHGKRGYPMVDLEEEDFSQELDTEWD EFLAQALTGLLESRTFAADIESDRYFTIPQRFRRSGGIARRCCASGCSSSDIAKLC
(B)	TRLCGRELSRAIYRICSHGGSGSHHHHHHGGSGSGGIARRCCASGCSSSDIAKLC

Hình 1. Trình tự amino axit của peptide thần kinh neuropeptide RGP (A) và thiết kế đoạn amino axit của hormone RGP phục vụ quá trình tái tổ hợp (B)

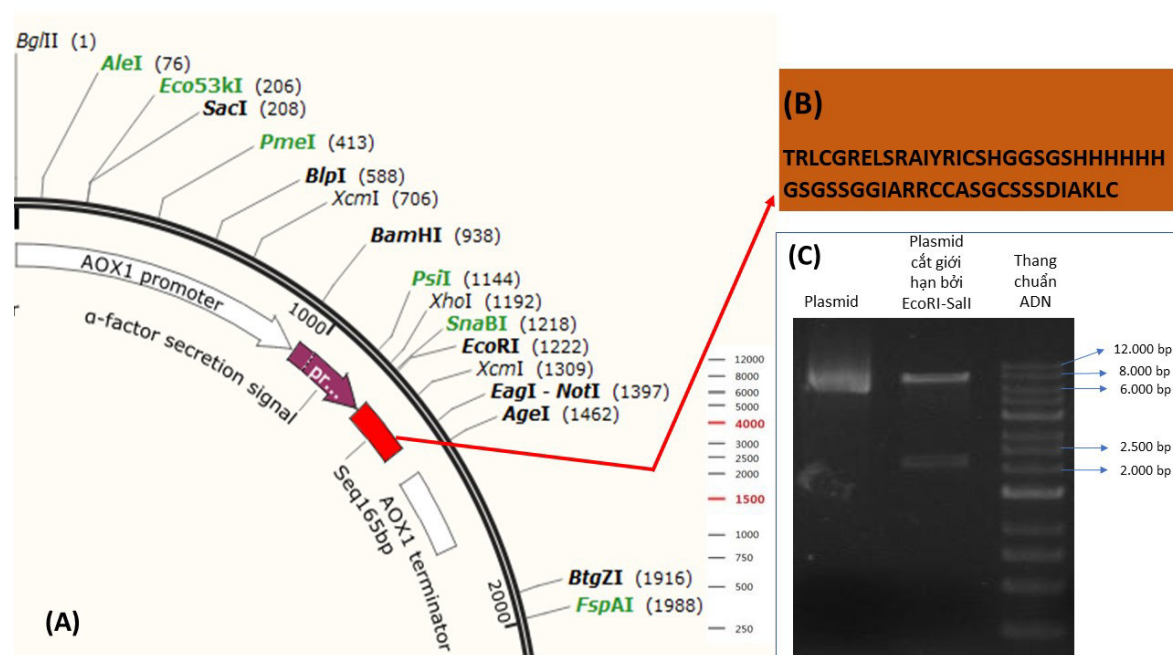
Ghi chú: Nền màu xanh là peptide tín hiệu (signal peptide); nền màu vàng là peptide kích hoạt (mature peptide); KR, RR là các vị trí cắt (cleavage site); chữ màu đỏ là His-tag.

Trong nghiên cứu này, pPIC9K (Invitrogen) cho vi khuẩn *E. coli* và nấm men *P. pastoris*, bởi vì chúng có các đặc điểm sau: Có trình tự nhân tố α

hỗ trợ việc tiết protein mục tiêu ra ngoài môi trường nuôi cấy, có mang gen mã hóa cho histidinol dehydrogenase giúp tế bào *P. pastoris* có khả năng tự tổng hợp histidine, có trình tự promoter AOX1 tương đồng với trình tự của AOX1 trong bộ gen của *P. pastoris* giúp chuyển trình tự gen mục tiêu vào bộ gen của tế bào. Có trình tự gen kháng ampicillin dùng để sàng lọc tế bào *E. coli* chứa gen tái tổ hợp, có gen kháng kanamycin giúp *P. pastoris* kháng lại geneticin dùng để chọn lọc tế bào *P. pastoris* chứa gen tái tổ hợp đồng thời xác định tương đối số bản sao của gen được chèn vào bộ gen của tế bào dựa vào nồng độ geneticin tế bào có khả năng kháng được. Trình tự cắt duy nhất của NotI, BglII, SacI và SalI dùng để làm thẳng vector trước khi chuyển vào tế bào *P.*

pastoris và tạo tái tổ hợp Mut⁺ (sử dụng methanol mạnh nên tăng sinh khối trên môi trường có methanol) hoặc Mut^S (sử dụng methanol ít nên tăng sinh khối trên môi trường có methanol).

Sau khi cấu trúc gen RGP được tổng hợp, đã được đưa vào vector biểu hiện pPIC9K để tạo thành pPIC9K-RGP. Cấu trúc vector tái tổ hợp pPIC9K-RGP chứa đoạn gen RGP 165 bp (đoạn màu đỏ trong hình 2A, 2B) và ba vị trí cắt giới hạn của ba enzyme EcoRI (1222), NotI (1397), SalI (3339) (Hình 2A). Kết quả kiểm chứng enzym cắt giới hạn EcoRI và SalI đã thành công với 2 band có kích thước khác nhau khi so sánh với 1 band của plasmid (Hình 2C).



Hình 2. Đoạn gen RGP được đưa vào vector pPIC9K và kiểm tra khả năng cắt giới hạn bởi enzym EcoRI và SalI.

Ghi chú: (A) thể hiện sơ đồ vùng chèn đoạn gen hormone RGP vào vector pPIC9K; (B) thể hiện chuỗi peptide của đoạn gen hormone RGP; (C) thể hiện kết quả kiểm chứng cắt giới hạn bằng enzyme EcoRI và SalI.

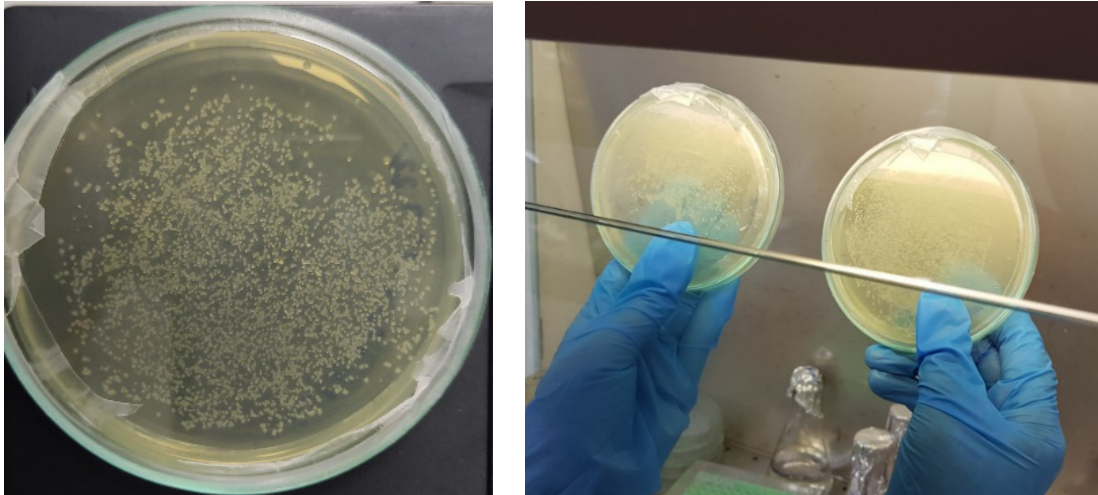
3.2. Kết quả biến nạp plasmid pPIC9K-RGP vào tế bào *E. coli*

Do gen kháng kháng sinh ampicillin được thiết kế trên plasmid pPIC9K nên các thể biến nạp mang plasmid tái tổ hợp pPIC9K-RGP được sàng

lọc bằng cách trải trên đĩa môi trường nuôi cấy LB chứa kháng sinh ampicillin. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các khuẩn lạc trắng đã mọc trên đĩa thạch LB có kháng sinh. Như vậy, plasmid tái tổ hợp pPIC9K-RGP đã được biến nạp thành công vào tế bào *E. coli* khả biến (Hình 3).

Sau khi biến nạp thành công, các khuẩn lạc mang plasmid tái tổ hợp pPIC9K-RGP đã được tách riêng và nuôi trên đĩa thạch LB có kháng sinh để phục vụ phân tích tiếp theo. Sau 12 giờ nuôi cấy

trong tủ ấm với nhiệt độ 37°C khuẩn lạc *E. coli* có màu trắng ngà, không nhiễm tạp nên có thể nhận định chủng *E. coli* thu được trên đĩa đều mang plasmid pPIC9K-RGP tái tổ hợp.

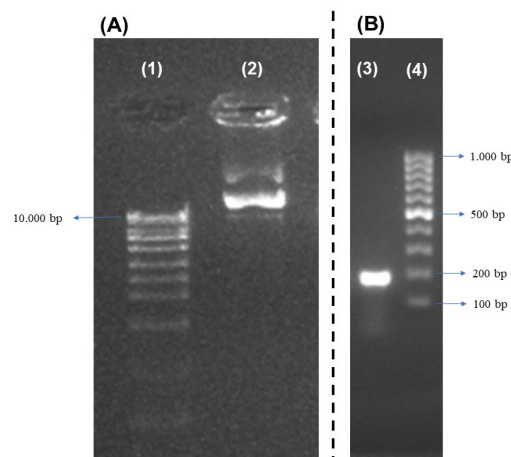


Hình 3. Plasmid tái tổ hợp pPIC9K-RGP đã được biến nạp thành công vào tế bào *E. coli* phát triển tốt trên môi trường đĩa thạch LB chứa kháng sinh ampicillin

3.3. Kết quả sàng lọc các tế bào *E. coli* mang plasmid pPIC9K-RGP

Những tế bào *E. coli* tiếp nhận plasmid tái tổ hợp mới có khả năng kháng ampicilin và phát triển được trên đĩa thạch LB có chứa kháng sinh. Tuy nhiên, không phải tế bào chứa plasmid nào cũng chứa đoạn gen RGP. Do đó, các khuẩn lạc dự

tuyển này tiếp tục được sàng lọc để xác nhận sự hiện diện của gen RGP bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc. Các khuẩn lạc chứa plasmid tái tổ hợp pPIC9K-RGP theo đúng thiết kế đã cho band có kích thước tương ứng 9.438 bp (Hình 4A). Đồng thời, kết quả chạy PCR kiểm chứng đoạn gen RGP đã cho band có kích thước tương ứng 165 bp (Hình 4B).



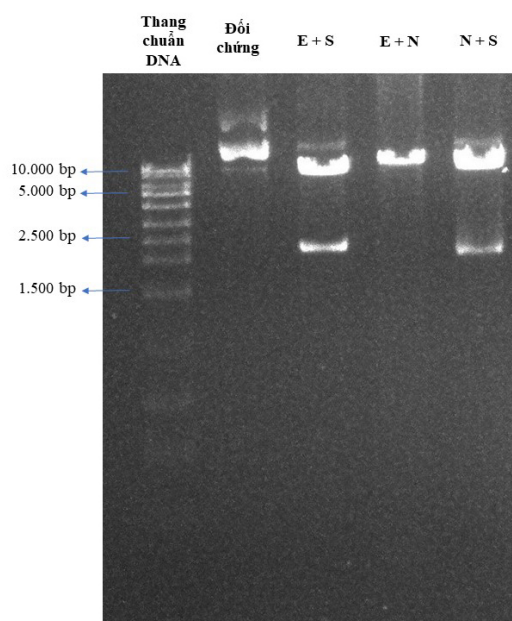
Hình 4. Kết quả kiểm chứng *E. coli* mang plasmid pPIC9K-RGP thông qua sản phẩm PCR hiển thị trên gel agarose 1%

Ghi chú: Hình (A): số (1) thể hiện thang chuẩn ADN, số (2) thể hiện mẫu plasmid pPIC9K-RGP; Hình (B): số (3) thể hiện band sáng thể hiện sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen RGP, số (4) thể hiện thang chuẩn ADN.

3.4. Kết quả nuôi cấy *E. coli* mang plasmid pPIC9K-RGP trong môi trường dung dịch LB có kháng sinh và tách chiết plasmid

Sau khi cấy *E. coli* mang plasmid pPIC9K-RGP trong khoảng 12 tiếng trong máy ủ nhiệt ở 37°C và có tốc độ vòng quay là 160 vòng/phút, thu được

dung dịch có chứa *E. coli* mang plasmid pPIC9K-RGP. Sau đó tiến hành đo nồng độ OD của chúng, nồng độ OD thu được tại các bình nuôi cấy *E. coli* đạt trung bình là 0,23. Như vậy, sản phẩm hoàn toàn đạt đủ yêu cầu để tiếp tục tiến hành bước tiếp theo để tách chiết plasmid pPIC9K-RGP từ *E. coli*.



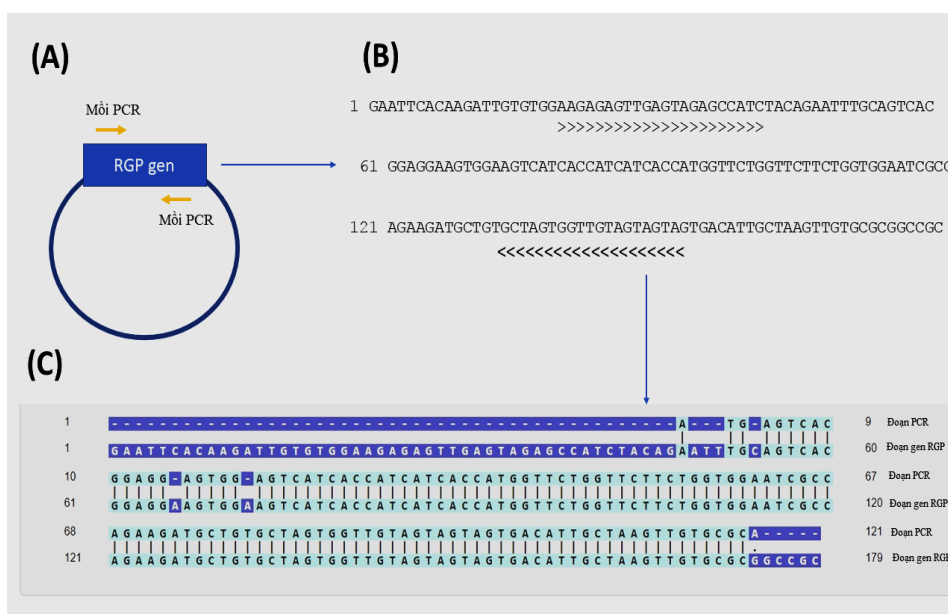
Hình 5. Kết quả tách chiết plasmid pPIC9K-RGP từ *E. coli* và thực hiện cắt giới hạn bằng các enzym

Ghi chú: Đối chứng là plasmid pPIC9K-RGP; E + S là cắt giới hạn đồng thời bằng enzym *EcoRI* và *Sall*; E + N là cắt giới hạn đồng thời bằng enzym *EcoRI* và *NotI*; N + S là cắt giới hạn đồng thời bằng enzym *NotI* và *Sall*.

Sau khi plasmid pPIC9K-RGP được làm sạch bằng KIT QIAprep Spin Miniprep, sản phẩm ADN được lưu giữ ở nhiệt độ -20°C. Kết quả đo nồng độ OD của sản phẩm ADN đạt trung bình là 0,106 (µg/µl). Tiếp tục thực hiện thao tác cắt giới hạn plasmid pPIC9K-RGP bằng *EcoRI*, *Sall*, *NotI* và kiểm tra sản phẩm trên gel agarose 1%. Kết quả cho thấy, khi sử dụng đồng thời cặp enzym *EcoRI* + *Sall* hoặc cặp enzym *NotI* + *Sall*, sản phẩm thu được là các mẫu gel có band dao động khoảng 600 – 700 bp. Kết quả này hoàn toàn trùng khớp với kiểm chứng ban đầu về plasmid pPIC9K-RGP của Tập đoàn Genscript (Hoa Kỳ). Do đó có thể khẳng định rằng, sản phẩm plasmid pPIC9K-RGP có thể thực hiện cắt giới hạn bởi các enzyme *EcoRI* và *Sall* và *NotI* (Hình 5). Tuy nhiên, khi sử dụng cặp enzym *EcoRI* + *NotI* để cắt giới hạn plasmid

pPIC9K-RGP thì sản phẩm không tạo thành các band riêng, cần có những thử nghiệm tiếp theo.

Sau khi tách chiết plasmid pPIC9K-RGP từ *E. coli*, tiến hành chạy PCR và giải trình tự sản phẩm cho thấy, 98% tương đồng giữa đoạn sản phẩm PCR và đoạn gen RGP (Hình 6). Mỗi PCR được thiết kế theo kiểu insert-specific chỉ khuếch đại trình tự trong đoạn gen hormone RGP đã được chèn vào vector. Kết quả này cho thấy, đoạn gen RGP mã hóa hormone kích thích sinh sản hải sâm đã được cấu trúc trong vi khuẩn *E. coli* JM109. Chúng vi khuẩn tái tổ hợp này được bảo quản ở nhiệt độ -80°C. Đây là một sản phẩm nguyên liệu đầu vào quan trọng để thực hiện nghiên cứu biểu hiện hormone RGP trên nấm men *P. pastoris* nhằm tạo ra lượng hormone lớn cho sản xuất giống hải sâm.



Hình 6. Kết quả giải trình tự sản phẩm tách chiết plasmid pPIC9K-RGP từ *E. coli*

Ghi chú: (A) thể hiện đoạn mỗi PCR được thiết kế khuếch đại trong chuỗi trình tự gen RGP (kiểu insert-specific) được chèn trong vector pPIC9K; (B) thể hiện chi tiết trình tự mỗi PCR và đoạn gen RGP; (C) thể hiện kết quả giải trình tự sản phẩm PCR.

4. KẾT LUẬN

Kết quả thiết kế đoạn gen RGP mã hóa hormone kích thích sinh sản hải sâm và đã chèn vào vector pPIC9K là bước kỹ thuật quan trọng để thực hiện các kỹ thuật tái tổ hợp tiếp theo. Plasmid pPIC9K-RGP đã được biến nạp vào tế bào *E. coli* khả biến và được sàng lọc thông qua môi trường LB có chứa kháng sinh ampicilin. Sản phẩm plasmid pPIC9K-RGP từ *E. coli* có thể thực hiện cắt giới hạn bởi các enzym EcoRI, SalI và NotI, đồng thời đã được kiểm tra bằng giải trình tự gen. Việc tạo dòng vi khuẩn *E. coli* mang gen RGP là một trong những kết quả nghiên cứu quan trọng để thực hiện nghiên cứu biểu hiện hormone RGP trên nấm men *P. pastoris* và sản xuất hormone kích thích sinh sản hải sâm ở quy mô lớn.

LỜI CẢM ƠN

Bài báo được hoàn thành dựa trên kết quả nghiên cứu của đề tài khoa học cấp Bộ Nông nghiệp và PTNT “Nghiên cứu quy trình sản xuất hormone kích thích sinh sản một số loài hải sâm có giá trị kinh tế ở vùng biển Việt Nam” - thực hiện từ năm 2022 – 2024, mã số: 46/2022/HĐ-KHCN-TS.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ker A. M and Kim J (2001). Phylogeny of Holothuroidea (Echinodermata) inferred from morphology. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 133 (1), 63 - 81. doi:10.1006/zjls.2000.0280.
2. Purcell S. W., Samyn Y. and Chantal C. (2012). Commercially important sea cucumbers of the world. *FAO Species Catalogue for Fishery Purposes* No. 6, Rome, 150 pp.
3. Đào Tấn Hồ (2006). Đặc điểm hình thái các loài hải sâm có giá trị thương mại ở biển Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ biển*, 2, 70 - 89.
4. Ngô Chí Thiện (1996). Nghiên cứu các biện pháp bảo tồn các loài hải sâm khu vực Nha Trang - Khánh Hòa. Báo cáo kết quả thực hiện đề tài.
5. Vũ Đình Đáp, Nguyễn Văn Giang và Phạm Thị Anh (2012). Điều tra thực trạng thành phần loài hải sâm phân bố ở một số vùng biển Việt Nam. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, 1, 65 - 70.
6. Chieu H. D., Turner L., Smith M. K., Wang T., Nocillado J., Palma P., Suwansa-ard S., Elizur A

- and Cummins S. F. (2019). Aquaculture breeding enhancement: Maturation and spawning in sea cucumbers using a recombinant Relaxin-Like Gonad-Stimulating Peptide. *Front. Genet.* 10:77. doi: 10.3389/fgene.2019.00077.
7. Mita M. (2013). Relaxin-like gonad-stimulating substance in an echinoderm, the starfish: a novel relaxin system in reproduction of invertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* 181, 241 - 245. doi: 10.1016/j.ygcen.2012.07.015.
8. Smiley S. (1990). A review of echinoderm oogenesis. *J. Electron Microsc. Tech.* 16, 93 - 114.
9. Mercier A., Sims D., and Hamel J. F. (2009). Endogenous and exogenous control of gametogenesis and spawning in echinoderms. *Adv. Mar. Biol.* 55, 1 - 302. doi: 10.1016/S0065-2881(09)55001-8.

CONSTRUCTION OF *E. coli* STRAINS WITH THE RGP GENE ENCODING THE SEA CUCUMBER GONAD-STIMULATING HORMONE

Hoang Dinh Chieu¹, Luu Xuan Hoa¹, Bui Minh Tuan¹, Nguyen Thi Tuyet Mai¹,
Nguyen Kim Thoa¹, Dong Thi Dung¹, Do Anh Duy¹

¹ Research Institute for Marine Fisheries

Summary

Relaxin-like Gonad-stimulating Peptide (RGP) hormone is an advanced and effective solution in sea cucumber artificial breeding. In order to produce a large amount of RGP hormone with high biological activity, it is necessary to use recombinant protein technology through *E. coli* bacteria and *P. pastoris* yeast. Therefore, in this study, the pPIC9K vector was designed to carry the RGP gene (pPIC9K-RGP). The *E. coli* JM109 strain was constructed to carry the recombinant pPIC9K-RGP plasmid. After screening with the antibiotic ampicillin, *E. coli* colonies carrying the recombinant pPIC9K-RGP plasmid were produced. The DNA sequencing results of the pPIC9K-RGP plasmid from *E. coli* showed that the expression of the RGP gene encoding the sea cucumber reproductive stimulating hormone had been constructed in *E. coli*. This is an important step towards continuing the expression of the RGP hormone in *P. pastoris* yeast and the production of recombinant RGP hormone for sea cucumber breeding in Vietnam.

Keywords: *E. coli*, sea cucumbers, recombinant hormone, RGP.

Ngày nhận bài: 7/5/2024

Ngày chuyển phản biện: 18/6/2024

Ngày thông qua phản biện: 10/10/2024

Ngày duyệt đăng: 16/01/2025