

## TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN PROTEIN TÁI TỔ HỢP hMMP-1 (HUMAN MATRIX METALLOPROTEINASE 1) TRONG *E. COLI* BL21

Nguyễn Trọng Bình<sup>1\*</sup>, Trần Phú Hiền<sup>2</sup>, Chương Thị Ngọc Hiếu<sup>1</sup>, Nguyễn Thiện Phương<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

### TÓM TẮT

MMP-1 là protein họ Matrix metalloproteinase, thuộc nhóm collagenase. Protein có khả năng phân hủy collagen loại I, II và III, các phân tử ECM (fibronectin, gelatin, aggrecan, laminin, perlecan và vitronectin) và một số protein hòa tan khác. MMP-1 đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát triển, hình thành mô, sửa chữa các vết thương và cải thiện xơ gan... Hoạt động bất thường của MMP-1 có mối liên quan chặt chẽ đến sự xuất hiện và phát triển khối u, bệnh viêm khớp, bệnh Alzheimer... MMP-1 có nhiều vai trò quan trọng nhưng hiện nay MMP-1 có giá thành trên thị trường khá cao. Trong nghiên cứu này với mục tiêu sản xuất ra lượng lớn protein MMP-1 phục vụ cho nghiên cứu và ứng dụng. Đầu tiên, gen mã hóa MMP-1 được khuếch đại bằng phản ứng PCR rồi nối với vector pET28a. Sau khi kiểm tra sự hiện diện của gen bằng phương pháp PCR khuôn lạc, cắt kiểm tra với hai enzyme cắt giới hạn *EcoRI* và *HindIII*, vector pET28a-MMP-1 được hóa biến nạp để biểu hiện trong *E. coli* BL21 (DE3). Protein được thu nhận sau khi cảm ứng bằng 0.4 mM IPTG ở các điều kiện 37°C trong 6 giờ; 28°C trong 16 giờ; 16°C trong 18 giờ. Protein sau thu nhận, tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực với hạt Ni Sepharose và kiểm tra bằng SDS-PAGE, Western blot. Kết quả nghiên cứu đã tạo dòng, biểu hiện thành công protein MMP-1 tái tổ hợp tồn tại dạng thể vùi trong tế bào chất ở cả ba điều kiện khảo sát, tinh sạch và thu được 3,297 mg protein MMP-1 với kích thước khoảng 47 kDa trong 1 lít dịch lên men, độ tinh sạch 92,32% và hiệu suất tinh sạch 38,72%.

**Từ khóa:** Collagen, *E. coli* BL21 (DE3), Matrix metalloproteinase, MMP-1, pET28a.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Human Matrix Metalloproteinase 1 (MMP-1) còn được gọi là collagenase 1, là một enzyme đóng vai trò quan trọng trong nhiều quá trình sinh học thiết yếu. MMP-1 giúp phá vỡ các thành phần của ma trận ngoại bào (ECM), chẳng hạn như collagen và elastin, cho phép các tế bào di chuyển, tái cấu trúc mô và sửa chữa tổn thương. MMP-1 có liên quan đến quá trình phát triển phôi thai, hình thành cơ quan và phân hóa tế bào. Bên cạnh đó, MMP-1 cũng đóng vai trò quan trọng trong phản ứng viêm và quá trình miễn dịch, giúp các tế bào miễn dịch di chuyển đến vị trí bị nhiễm trùng và tiêu diệt vi sinh vật. Trong nhiều loại ung thư, sự biểu hiện quá mức của MMP-1 thúc đẩy sự phát triển, di căn và xâm lấn của khối u. Đối với sự phát triển một số bệnh như bệnh viêm khớp, MMP-1 có liên quan đến sự thoái hóa sụn khớp trong viêm khớp. Với bệnh tim mạch, MMP-1 có liên quan đến sự hình thành mảng bám trong động mạch, có thể dẫn đến đau tim và đột quỵ.

MMP-1 là một glycoprotein bao gồm một chuỗi polypeptide đơn có trọng lượng phân tử khoảng 52 kDa. Gen mã hóa protein MMP-1 được xác định nằm trên nhiễm sắc thể 11 tại vị trí q22,2 với độ dài là 1971 bp với 10 exon và 9 intron. Cấu trúc của MMP-1 bao gồm một vùng xúc tác chứa các ion kim loại kẽm cần thiết cho hoạt động enzyme, một vùng liên kết collagen giúp MMP-1 gắn vào collagen, và một vùng đuôi tham gia vào sự tương tác với các protein khác. Ngoài ra, MMP-1 có thể được kích hoạt bởi các protein khác, ví dụ như plasmin và proteinase-3. Do đóng vai trò quan trọng, MMP-1 là chủ đề của nhiều nghiên cứu gần đây nhằm hiểu rõ hơn về chức năng của nó và phát triển các phương pháp điều trị mới cho các bệnh liên quan đến MMP-1. Đối với bệnh ung thư, các nhà nghiên cứu đang nghiên cứu các phương pháp nhắm mục tiêu MMP-1 để điều trị ung thư, chẳng hạn như sử dụng các chất ức chế MMP-1 hoặc các liệu pháp miễn dịch nhắm mục tiêu MMP-1. MMP-1 có liên quan đến sự hình thành mảng bám trong động mạch, vì vậy kiểm soát MMP-1 hỗ trợ điều trị các bệnh tim mạch. Một số nghiên cứu gần đây cũng cho thấy ứng dụng của MMP-1 để làm chậm hoặc ngăn chặn sự tiến triển của bệnh viêm khớp, thúc đẩy phục hồi vết thương do kích hoạt tiêu cầu có khả năng phân hủy collagen dạng sợi (Austin *et al.*, 2013) và ngăn ngừa hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh Alzheimer (Zhang *et al.*, 2023).

Nhìn chung, MMP-1 là một enzyme quan trọng tham gia vào nhiều quá trình sinh học thiết yếu. Nhờ khả năng phân hủy collagen mà MMP-1 được đồng sử dụng với ghép tế bào gốc trung mô từ tủy xương mờ ra cơ hội điều trị cho các bệnh nhân xơ gan (Du *et al.*, 2018); hỗ trợ điều trị sẹo lồi, sẹo phì đại; điều trị các vết loét ở bệnh nhân tiểu đường do hỗ trợ quá trình tân sinh mạch máu, di chuyển của tế bào trong giai đoạn tăng sinh, làm co và tái cấu trúc mô ở giai đoạn sửa chữa (Ayuk *et al.*, 2016). Việc sử dụng MMP-1 trong thực tế lâm sàng vẫn đang

được nghiên cứu và phát triển. Một hướng nghiên cứu cũng ứng dụng MMP-1 là dùng để phát triển các mô hình mới để nghiên cứu bệnh lý, chẳng hạn như ung thư và bệnh tim mạch. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tạo dòng, biểu hiện và tinh sạch protein MMP-1 tái tổ hợp nhằm mục tiêu sản xuất lượng lớn protein phục vụ cho việc ứng dụng nghiên cứu.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Chủng chủ và plasmid

Chủng *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  được sử dụng để nhân bản vector. Chủng *Escherichia coli* BL21 (DE3) được sử dụng để biểu hiện vector tái tổ hợp. Plasmid pET28a+ được sử dụng làm vector biểu hiện protein tái tổ hợp nhờ vào T7 promoter, trình tự mã hóa lacI và các operator lac. Vì thế việc biểu hiện protein mục tiêu có thể được thúc đẩy bằng isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), một chất tương tự lactose. Các chủng vi sinh và plasmid được cung cấp từ công ty Novagen, Đức. Thành phần nuôi cấy vi khuẩn *Escherichia coli* tuân theo hướng dẫn từ nhà sản xuất Biobasic, Canada.

#### Phương pháp

##### Tạo dòng *E. coli* DH5 $\alpha$ mang gen mã hóa protein MMP-1

Thiết kế trình tự gen 1101 bp của MMP-1 từ vị trí 306 đến 1407 dựa trên cơ sở dữ liệu Genbank: NM\_002421.4. Để hỗ trợ cho quá trình cắt, trình tự gen có chứa vị trí cắt của hai enzyme cắt giới hạn *EcoRI* và *HindIII* (12 bp). Đoạn gen mục tiêu được khuếch đại bằng phương pháp phusion PCR tổng thể tích phản ứng là 50  $\mu$ L. Sau quá trình biến tính ban đầu ở 95°C trong 2 phút; 10 chu kỳ khuếch đại đầu tiên như sau: biến tính ở 95°C trong 30 giây, bắt cặp ở 52°C trong 30 giây và kéo dài ở 72°C trong 60 giây; 20 chu kỳ khuếch đại tiếp theo được thực hiện như sau: biến tính ở 95°C trong 30 giây, bắt cặp ở 60°C trong 30 giây và kéo dài ở 72°C trong 60 giây; bước kéo dài sau cùng ở 72°C trong 10 phút và kết thúc phản ứng giữ ở 10°C.

Sản phẩm PCR khuếch đại gen mục tiêu sau khi được tinh sạch bằng GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific<sup>TM</sup>). Sản phẩm PCR và plasmid pET28a lần lượt được xử lý với hai enzyme cắt giới hạn *EcoRI* và *HindIII*. Sản phẩm cắt được điện di trên gel agarose 0,8% và được tinh sạch bằng GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific<sup>TM</sup>). Tiến hành nối gen MMP-1 với plasmid pET28a dưới tác động của enzyme T4 DNA ligase. Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 $\alpha$  bằng phương pháp hóa biến nạp và sàng lọc trên môi trường LB agar có kháng sinh Kanamycin nồng độ 50  $\mu$ g/mL. Các khuẩn lạc dự tuyển sẽ được kiểm tra lại bằng phản ứng PCR khuẩn lạc với mỗi xuôi đặc hiệu cho pET28a (T7 promoter) và mỗi ngược đặc hiệu cho gen MMP-1. Để chắc chắn biểu hiện đúng protein MMP-1 đã nhân dòng chúng tôi tiến hành tách, tinh sạch plasmid pET28a-MMP-1 và lập phản ứng cắt kiểm tra cũng như giải trình tự gen bằng phương pháp Sanger.

##### Biểu hiện, tinh sạch và phát hiện protein tái tổ hợp MMP-1

Vector biểu hiện pET28a giúp tạo ra protein tái tổ hợp có gắn đuôi 6xHis ở đầu N, hỗ trợ quá trình tinh sạch bằng Ni Sepharose. Sau khi biến nạp thành công pET28a-MMP-1 vào chủng *E. coli* BL21 (DE3), tiến hành nuôi cấy sơ cấp *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-MMP-1 trong môi trường LB/Kanamycin ở 37°C, 250 vòng/phút, nuôi cấy thứ cấp đến khi OD 600 nm đạt từ 0,6-0,8 thì bổ sung IPTG 0,4 mM. Quá trình biểu hiện protein khảo sát ở các điều kiện 37°C trong 6 giờ, 28°C trong 16 giờ, 16°C trong 18 giờ với tốc độ lắc 250 vòng/phút. Sau đó, tiến hành ly tâm dịch nuôi cấy để thu sinh khối vi khuẩn. Sinh khối được huyền phù với đệm (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 8M Urea, pH 8.0) phá mẫu bằng sóng siêu âm và thu riêng các tổng tế bào, phân đoạn dịch tế bào, cặn sau ly tâm. Sau đó, tiến hành kiểm tra bằng phương pháp điện di SDS-PAGE 12,5% và nhuộm với Coomassie Brilliant Blue G-250. Các mẫu đối chứng: *E. Coli* BL21 (DE3)/ pET28a và *E. coli* BL21 (DE3)/ pET28a-EGFP tiến hành đồng thời với mẫu thí nghiệm.

Sau khi xác nhận đã biểu hiện thành công protein MMP-1, dịch protein sẽ được loại bỏ sinh khối bằng phương pháp ly tâm tốc độ cao và lọc với kích thước lỗ lọc 0,45  $\mu$ m. Dịch protein sau lọc được tinh sạch theo bộ kit ProBond<sup>TM</sup> Purification system. Rửa cột với đệm rửa có nồng độ imidazole 20 mM. Sau đó, các protein trên cột được tái gấp cuộn bằng các dung dịch đệm có nồng độ ure giảm dần. Cuối cùng, protein trên cột sẽ được thôi giải bằng dung dịch thôi giải có nồng độ Imidazole cao (500 mM). Protein sau khi tinh sạch được kiểm tra bằng phương pháp điện di SDS-PAGE 12.5% và nhuộm với Coomassie Brilliant Blue G-250.

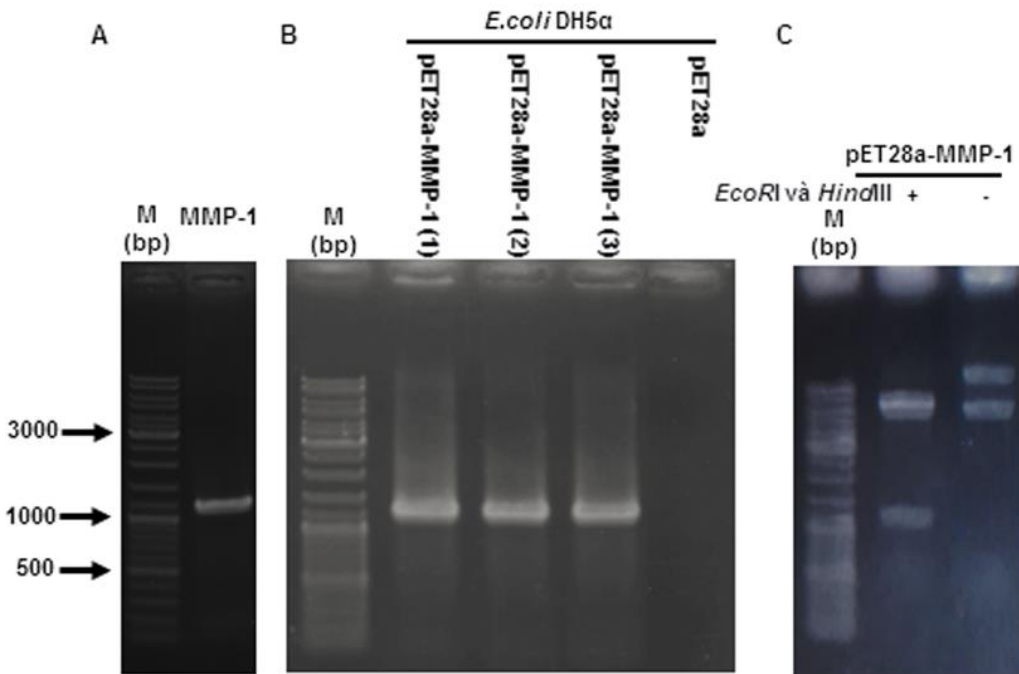
Ngoài ra, sự hiện diện của protein tái tổ hợp còn được xác nhận bằng phương pháp Western Blot với kháng thể đặc hiệu. Kháng thể sơ cấp sử dụng (Anti-6X His tag® antibody [HIS.H8]) đặc hiệu với protein MMP-1 tái tổ hợp và kháng thể thứ cấp (Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP)) được đánh dấu bằng horseradish peroxidase. Màu được phát hiện nhờ phản ứng xúc tác của peroxidase trên cơ chất luminol và H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ở bước sóng 425 nm. Kích thước protein MMP-1 tái tổ hợp được dự đoán khoảng 47 kDa.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Tạo dòng *E. coli* DH5 $\alpha$ mang gen mã hóa protein MMP-1

Từ Hình 1A cho thấy gen mục tiêu MMP-1 sau khi được khuếch đại và điện di trên gel agarose 0,8% thu nhận được duy nhất một đoạn gen có kích thước khoảng 1113 bp tương ứng với kích thước khi thiết kế của gen MMP-1. Điều này chứng tỏ rằng đã khuếch đại được đoạn gen mục tiêu mã hóa cho protein MMP-1 tái tổ hợp.

Gen MMP-1 và plasmid pET28a+ được nối với nhau sau khi tạo đầu dính bằng cặp enzyme cắt giới hạn là *EcoRI* và *HindIII*. Sản phẩm nối được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$ . Sàng lọc bước đầu plasmid pET28a+-MMP-1 dựa trên môi trường nuôi cấy LB có chứa kháng sinh Kanamycin (50  $\mu$ g/ml), những khuẩn lạc dự tuyển được kiểm tra bằng phương pháp PCR với mỗi T7 và MMP-1 cho kết quả điện di kích thước khoảng 1313 bp bằng kích thước của gen MMP-1 (1113 bp) cộng với chiều dài của plasmid không có gen chèn khi được khuếch đại bằng đoạn mỗi T7 promoter (Hình 1B). Các khuẩn lạc dương tính được tiếp tục nuôi cấy và tách plasmid để cắt kiểm tra. Plasmid pET28a-MMP-1 khi cắt với enzyme cắt giới hạn *EcoRI* và *HindIII* cho ra kích thước 1113 bp phù hợp với gen mục tiêu (Hình 1C). Ngoài ra, Kết quả giải trình tự gen cho thấy trình tự gen giống với trình tự khi thiết kế gen MMP-1 (Dữ liệu không trình bày).

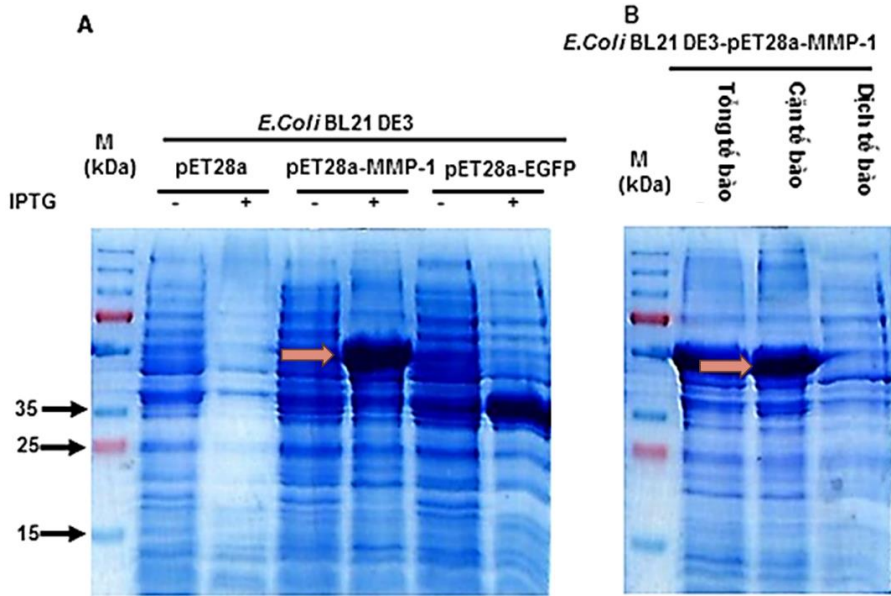


**Hình 1. Kết quả nhân dòng gen mã hóa protein MMP-1.** Sản phẩm khuếch đại gen MMP-1 bằng cặp mỗi đặc hiệu cho gen (A). Kết quả PCR khuẩn lạc bằng mỗi xuôi T7 promoter đặc hiệu cho vector pET28a và mỗi ngược đặc hiệu cho gen (B). Kết quả cắt kiểm tra plasmid bằng enzyme cắt giới hạn *EcoRI* và *HindIII* (C). M. Thang kích thước DNA.

### Biểu hiện, tinh sạch và phát hiện protein tái tổ hợp MMP-1

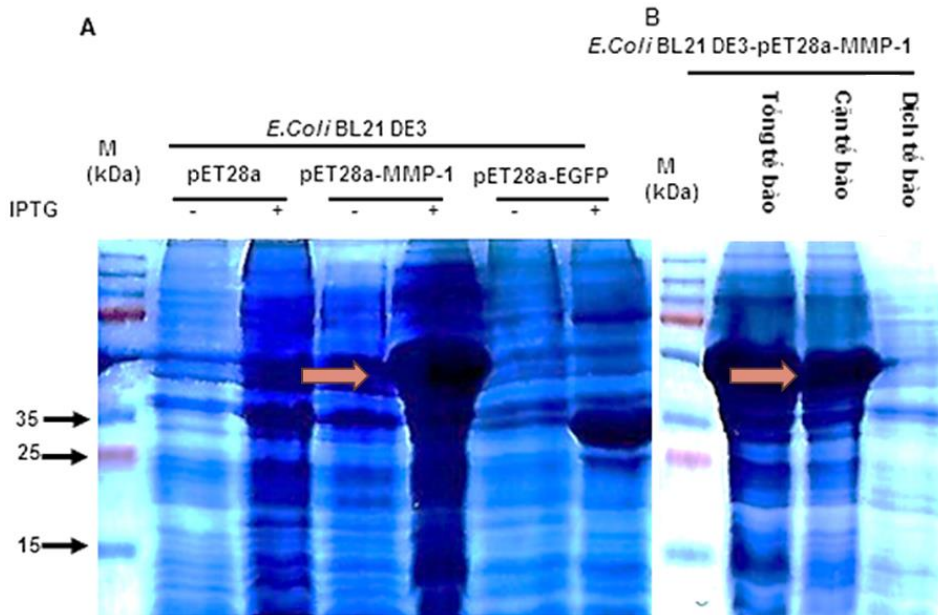
Sau khi nhân dòng thành công, plasmid pET28a-MMP-1 được biến nạp vào chủng vi khuẩn *Escherichia coli* BL21 (DE3), và biểu hiện trong điều kiện có chất cảm ứng IPTG và đối chứng không có chất cảm ứng. Biểu hiện ở các nhiệt độ 37°C, 28°C và 16°C. Tế bào *E. coli* được phá vỡ mẫu bằng sóng siêu âm và kiểm tra protein sau phá mẫu bằng điện di SDS-PAGE 12,5% và nhuộm với Coomassie Brilliant G-250.

Kết quả phân tích ở nhiệt độ 37°C (Hình 2A) cho thấy có một vạch protein biểu hiện vượt mức ở giếng có bổ sung IPTG pET28a-MMP-1 (+) với kích thước khoảng 47 kDa đúng với kích thước MMP-1 đã dự đoán và không thấy sự biểu hiện của vạch này ở đối chứng âm là plasmid pET28a (+) không chứa gen mục tiêu, có cảm ứng IPTG. Điều kiện biểu hiện được kiểm soát bởi chứng dương là plasmid pET28+-EGFP chứa gen EGFP, sự biểu hiện vượt mức của gen EGFP (kích thước ~ 35kDa) quan sát được ở giếng có bổ sung chất cảm ứng IPTG. Bên cạnh đó kết quả điện di cho thấy có sự khác biệt khi không có chất cảm ứng và có chất cảm ứng (Hình 2A, Hình 3A, Hình 4A) ở cả 3 nhiệt độ khảo sát. Khi không có cảm ứng IPTG thì protein tổng của *E. coli* được biểu hiện nhiều hơn nhưng khi có cảm ứng IPTG thì protein mục tiêu lại được biểu hiện nhiều hơn. Protein MMP-1 sau khi biểu hiện chủ yếu nằm ở dạng thể vùi trong pha cặn sau ly tâm với kích thước 47 kDa, điều này thể hiện ra trong kết quả điện SDS-PAGE (Hình 2B).



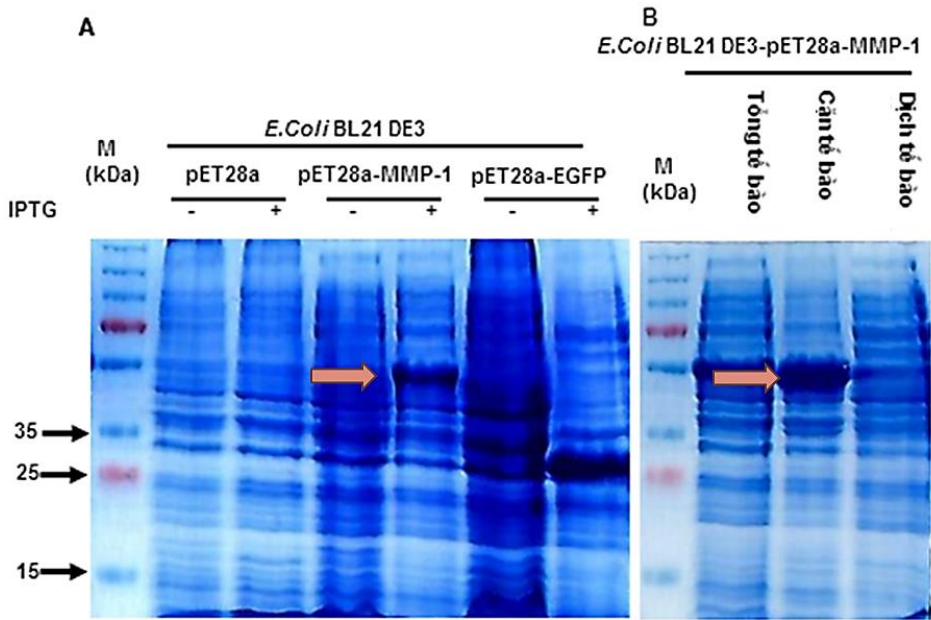
Hình 2. Kết quả điện di SDS-PAGE của tổng protein biểu hiện khi không có cảm ứng IPTG (-) và không có cảm ứng IPTG (+) ở 37°C (A) và biểu hiện của protein mục tiêu ở các pha tổng tế bào, cận tế bào và dịch tế bào sau ly tâm (B). M là thang phân tử lượng protein

Kết quả tương tự cũng xảy ra ở nhiệt độ biểu hiện protein ở 28°C, protein MMP-1 vẫn được tế bào biểu hiện vượt mức ở 28°C với kích thước khoảng 47 kDa và protein nằm ở chủ yếu ở dạng thể vùi (Hình 3B). Tuy nhiên, ở nhiệt độ này đã thấy có xuất hiện protein biểu hiện ở dạng tan rã hơn so với 37°C. Sự biểu hiện vượt mức của đối chứng dương pET28a+EGFP cũng được ghi nhận ở nhiệt độ 28°C.



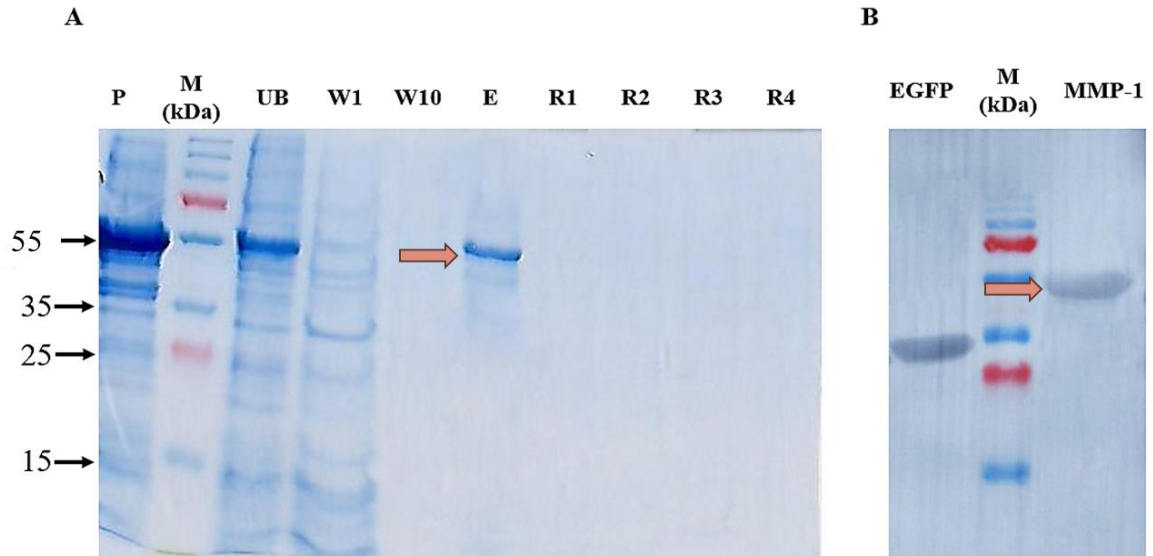
Hình 3. Kết quả điện di SDS-PAGE của tổng protein biểu hiện khi có cảm ứng IPTG và không có cảm ứng IPTG ở 28°C (A) và biểu hiện của protein mục tiêu ở các pha tổng tế bào, cận tế bào và dịch tế bào sau ly tâm (B). M là thang phân tử lượng protein

Kết quả phân tích SDS-PAGE (Hình 4B) cho thấy ở 16°C protein mục tiêu vẫn được biểu hiện vượt mức với kích thước khoảng 47 kDa nhưng lượng protein thấp hơn ở 37°C và 28°C. Tuy nhiên, protein MMP-1 có biểu hiện ở dạng dịch nổi ở 16°C có tỷ lệ lớn nhất ở cả 3 nhiệt độ. Bên cạnh đó, sự biểu hiện vượt mức của đối chứng dương pET28a+EGFP cũng được ghi nhận ở nhiệt độ 16°C.



Hình 4. Kết quả điện di SDS-PAGE của tổng protein biểu hiện khi có cảm ứng IPTG và không có cảm ứng IPTG ở 16°C (A) và biểu hiện của protein mục tiêu ở các pha tổng tế bào, cặn tế bào và dịch tế bào sau ly tâm (B). M là thang phân tử lượng protein

Protein sau khi biểu hiện và chọn ra nhiệt độ thích hợp thì protein MMP-1 sẽ được mang đi biểu hiện ở thể tích lớn và được tinh sạch bằng hạt Ni Sepharose, với chất cạnh tranh là imidazole. Sau khi qua trình tinh sạch, protein sẽ được kiểm tra bằng phương pháp SDS-PAGE với gel có nồng độ 12,5% acrylamide và đánh giá đặc hiệu bằng phương pháp Western blot với kháng thể kháng 6xHis tag.



Hình 5. Kết quả điện di SDS-PAGE sau tinh sạch (A) và Western Botting sau tinh sạch (B). M là thang phân tử lượng protein

Kết quả Western Blot cũng chỉ ra được đối với đối chứng dương pET28a-EGFP có kháng thể chống 6xHis cũng cho kết quả một vạch đúng kích thước khoảng 35 kDa, chứng tỏ quá trình thực hiện Western blot thành công. Kết quả điện di và kết quả Western Blot sau tinh sạch chỉ ra rằng MMP-1 tái tổ hợp đã được biểu hiện thành công trên chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-MMP-1 dưới dạng dung hợp với đuôi 6xHis tag và phần lớn protein MMP-1 thu được có một vạch đúng kích thước 47 kDa (Hình 5). Nồng độ protein được định lượng tương đối bằng phương pháp Bradford và mức độ tinh sạch của dung dịch protein thu được được phân tích hình ảnh bằng phần mềm ImageJ. Kết quả lượng protein thu được khoảng 3,297 mg, độ tinh sạch 92,32% trong 1 lít dịch lên men, hiệu suất tinh sạch là 38,72%.

So với nghiên cứu của nhóm tác giả Kumar L trước đây, biểu hiện được proMMP-1 với kích thước 54 kDa dạng tan và vùng xúc tác 28 kDa dạng thể vùi với lượng protein sau tinh sạch là 3,5 mg, nồng độ 0,5 mg/ mL từ 1 g vi khuẩn (Kumar *et al.*, 2018). Thì trong nghiên cứu này chúng tôi biểu hiện được protein MMP-1 với kích thước 47 kDa tồn tại ở dạng thể vùi và dạng tan, lượng protein sau khi tinh sạch từ thể vùi là 3,297 mg, độ tinh sạch 92,32% trong 1 lít lên men và hiệu suất tinh sạch 38,52%. Ngoài ra, chúng tôi còn xác định được phần trăm protein mục tiêu so với tổng protein biểu hiện ở từng pha tổng, cặn và dịch sau ly tâm, đây là điểm sáng và chưa ghi nhận ở các công bố nghiên cứu biểu hiện MMP-1 tái tổ hợp trước nay.

Việc protein MMP-1 có thể được biểu hiện ở cả 37°C, 28°C, 16°C cho thấy rằng khoảng nhiệt độ mà nó có thể được biểu hiện trong *E. coli* BL21 (DE3) rất rộng. Ngoài ra, vì đa phần protein MMP-1 biểu hiện ở dạng thể vùi sau khi được biểu hiện giúp bảo vệ protein khỏi sự phân hủy của các protease trong tế bào chất của *E. coli*, tránh thất thoát protein do bị phân huỷ. Tuy nhiên, hoạt tính sinh học của protein có thể bị ảnh hưởng sau khi tái gấp cuộn do quá trình gấp cuộn sai, ảnh hưởng đến hàm lượng protein MMP-1 có hoạt tính thực tế thu được. Do đó, hướng nghiên cứu tiếp theo mà nhóm nghiên cứu nhắm đến sau bước đầu biểu hiện thành công MMP-1 tái tổ hợp là tiến hành thử nghiệm hoạt tính của protein MMP-1 thu được và tiến hành tối ưu hóa quy trình tinh sạch để thu được hàm lượng cao protein MMP-1 có hoạt tính tối ưu.

## KẾT LUẬN

Chúng tôi đã nhân dòng thành công đoạn gen mã hóa cho protein MMP-1 với trình tự đúng hoàn toàn với trình tự gen đã thiết kế; tạo thành công dòng tế bào *E. Coli* BL21(DE3) mang vector pET28a-MMP-1 có khả năng biểu hiện protein MMP-1 tái tổ hợp. Nghiên cứu cho thấy protein MMP-1 biểu hiện vượt mức dưới dạng thể vùi trong *E. coli* BL21 (DE3) ở cả 3 nhiệt độ nghiên cứu và có biểu hiện dạng tan ở 28°C và 16°C khi có cảm ứng bằng IPTG, kích thước protein thu được khoảng 47 kDa. Thêm vào đó chúng tôi cũng đã tinh sạch được protein mục tiêu sau khi biểu hiện. Nghiên cứu đã bước đầu tạo được nguồn cung cấp MMP-1 tái tổ hợp cho các nghiên cứu tiếp theo hướng đến việc phát triển sản phẩm cho ứng dụng nghiên cứu tiếp theo.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Austin KM, Covic, L, Kuliopulos A (2013). Matrix metalloproteases and PAR1 activation. *Blood*, 121(3): 431-9.
- Ayuk SM, Abrahamse H, Houreld NN (2016). The role of matrix metalloproteinases in diabetic wound healing in relation to photobiomodulation. *J Diabetes Res*, 2: 89765-6.
- Dai L, Mugaanyi J, Cai X Dong M, Lu C, Lu C (2022). Comprehensive bioinformatic analysis of MMP1 in hepatocellular carcinoma and establishment of relevant prognostic model. *Sci Rep*, 12(1): 136-139.
- Du C, Jiang M, Wei X, Qin J, Xu H, Wang Y, Zhang Y, Zhou D, Xue H, Zheng S, Zeng W (2018). Transplantation of human matrix metalloproteinase-1 gene-modified bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates CCL4-induced liver fibrosis in rats. *Int J Mol Med*, 41(6): 3175-3184.
- Ita M, Singh S, Troche H, Welch R, Winkelstein B (2022). Intra-articular MMP-1 in the spinal facet joint induces sustained pain and neuronal dysregulation in the DRG and spinal cord, and alters ligament kinematics under tensile loading. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10: 926675.
- Kumar L, Colomb W, Czerski J, Cox CR, Sarkar SK (2018). Efficient protease based purification of recombinant matrix metalloprotease-1 in *E. coli*. *Protein Expr Purif*, 148: 59-67.
- Li J, Brick P, O'Hare MC, Skarzynski T, Lloyd LF, Curry VA, Clark IM, Bigg HF, Hazleman BL, Cawston TE, Blow, DM (1995). Structure of full-length porcine synovial collagenase reveals a C-terminal domain containing a calcium-linked, four-bladed;-propeller. *Structure*, 3(6): 541-549.
- Spurlino JC, Smallwood AM, Carlton DD, Banks TM, Vavra KJ, Johnson JS, Cook ER, Falvo J, Wahl RC, Pulvino TA (1994). 1.56 A structure of mature truncated human fibroblast collagenase. *Proteins*, 19(2): 98-109.
- Zhang H, Sun C, He B, Zhang X, Hao H, Hou Y, Li A, Wang Y, Wang Y (2023). Macrophage migration inhibitory factor promotes expression of matrix metalloproteinases 1 and 3 in spinal cord astrocytes following gecko tail amputation. *J Integrat Neurosci*, 22: 29.

## CLONING, EXPRESSION AND PURIFICATION OF GENE ENCODING PROTEIN hMMP-1 (HUMAN MATRIX METALLOPROTEINASE 1)

Nguyen Trong Binh<sup>1\*</sup>, Tran Phu Hien<sup>2</sup>, Chuong Thi Ngoc Hieu<sup>1</sup>, Nguyen Thien Phuong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

<sup>2</sup>Ho Chi Minh City University of Science

### SUMMARY

MMP-1 is a member of the matrix metalloproteinase family, specifically within the collagenase group. This protein has the ability to break down collagen types I, II, and III, as well as several other important proteins in the extracellular matrix. MMP-1 is involved in tissue formation, wound healing, and liver cirrhosis. However, abnormal MMP-1 activity is associated with conditions such as tumors, arthritis, and Alzheimer's disease. Despite its important roles, MMP-1 is currently quite expensive. In this study, we aimed to produce large quantities of MMP-1 protein for research and applications. To achieve this, we cloned the gene encoding the MMP-1 protein into the pET28a vector and used the *E. coli* BL21 strain (DE3) for protein expression. The gene encoding MMP-1 was amplified by PCR and then inserted into the pET28a vector. After confirming the presence of the gene by colony PCR and restriction enzyme digestion (*EcoRI* and *HindIII*), the pET28a-MMP-1 vector was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) after transformation. We induced protein expression using IPTG at different temperatures (37°C for 6 hours, 28°C for 16 hours, and 16°C for 18 hours). The expressed proteins were harvested, purified by affinity chromatography, analyzed using SDS-PAGE and Western blot and quantified by the Bradford measurement method. The results showed successful cloning and expression of recombinant MMP-1 protein in *E. coli*. We obtained 3,297 mg of MMP-1 protein per liter of fermentation liquid, with a purity of 92.32% and purification efficiency of 38.72%.

**Keywords:** Collagen, *E. coli* BL21 (DE3), Matrix metalloproteinase, MMP-1, pET28a.

---

\*Author for correspondence: Tel: 0904516 382, Email: ntbinh.snn@tphcm.gov.vn or ntbinhbiomedicine@gmail.com