

NGHIÊN CỨU TINH SẠCH PROTEIN hnRNPK BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ**Lê Quang Dũng^{1*}, Vũ Thị Minh Châu¹, Nguyễn Trung Kiên¹,
Phạm Văn Trà¹, Bùi Thị Vân Khánh¹**¹Khoa Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội*Tác giả chịu trách nhiệm khoa học: **Lê Quang Dũng**Tác giả liên hệ chính: **Lê Quang Dũng**

Email: dqle2020@gmail.com

TÓM TẮT:

hnRNPK là một protein liên kết DNA/RNA, tham gia vào các hoạt động liên kết axit nucleic và có vai trò quan trọng trong các quy trình sinh học trong tế bào. Do vậy, những bất thường trong biểu hiện của protein hnRNPK có liên quan mật thiết đến sự phát triển của nhiều loại ung thư. Từ đây mở ra nhu cầu biểu hiện và tinh sạch protein hnRNPK có chất lượng cao với số lượng đủ lớn để sử dụng cho các nghiên cứu về protein hnRNPK. Tuy nhiên sự không ổn định và kết tủa của protein hnRNPK trong quá trình tinh sạch là một trở ngại lớn trong quá trình nghiên cứu. Để khắc phục trở ngại này, đề tài đã tối ưu hóa quy trình tinh sạch với nồng độ muối KCl cao, đồng thời sử dụng Green fluorescent protein (GFP) để hỗ trợ quá trình tinh sạch. GFP là một công cụ hữu ích để theo dõi chất lượng của protein trong quá trình tinh sạch protein, thêm vào đó nồng độ cao của muối KCl trong các đệm cũng có tác dụng ngăn chặn kết tủa của protein hnRNPK. Sắc ký ái lực Niken kết hợp với sắc ký lọc gel có thể tách được protein hnRNPK với độ tinh sạch cao. Tuy nhiên, để phục vụ cho các nghiên cứu về cấu trúc và chức năng của protein hnRNPK, nồng độ muối KCl cuối cùng phải được hạ xuống nồng độ muối sinh lý là 300 mM KCl. Tại nồng độ muối thấp, sự ổn định của protein hnRNPK khó có thể duy trì, do vậy trong tương lai nên kết hợp thêm các phương pháp khác để hạn chế được tối đa sự kết tủa của protein hnRNPK.

Từ khóa: hnRNPK, kết tủa, sắc ký ái lực Ni, sắc ký lọc gel, cấu trúc đơn phân**1. GIỚI THIỆU:**

Heterogeneous nuclear ribonucleo-protein K (hnRNPK) là một protein ở người cùng nhiều loài động vật, và được mã hóa bởi gen hnRNPK (1, 2). Protein này khu trú ở nhiều vị trí trong tế bào (1, 3), tham gia vào các cơ chế sinh học khác nhau như điều hòa phiên mã, dịch mã, quá trình truyền tín hiệu trong tế bào (1). hnRNPK có thể tham gia vào các cơ chế đa dạng là do cấu trúc của protein này chứa nhiều vùng chức năng khác nhau bao gồm ba vùng KH cho các tương tác với DNA và RNA (1, 4, 5), KI cho tương tác với các protein khác, cũng như hai vùng NLS và KNS giúp hnRNPK di chuyển được hai chiều qua màng nhân tế bào (6-8).

Trong quá trình tinh sạch protein hnRNPK, sự kết tủa của protein này ở nồng độ muối thấp là một trở ngại lớn

cho các nghiên cứu liên quan đến hnRNPK (4). Có nhiều yếu tố có thể dẫn đến sự kết tủa của protein hnRNPK như lỗi trong quá trình cuộn gập protein, tính tan thấp của protein, hay hiệu quả thấp trong quá trình phiên mã và dịch mã. Protein chỉ thị GFP, với khối lượng phân tử nhỏ (25-30 kDa) và cơ chế phát huỳnh quang độc lập không cần cofactors, là một giải pháp hiệu quả giúp phát hiện nhanh kết tủa trong quá trình tổng hợp protein tái tổ hợp (8-10). Ngoài ra, nâng cao nồng độ muối trong dung dịch đệm có khả năng quay ngược quá trình kết tủa và duy trì được hnRNPK ở dạng đơn phân (4).

Gen GFP và hnRNPK cùng được gắn vào vector pETM11 trước khi biến nạp vào vi khuẩn *E.coli* Rosetta 2(DE3). Kết quả của quá trình biểu hiện protein cho ra sản phẩm là protein tái tổ hợp có

màu xanh đặc trưng của GFP. Thêm vào đó, nồng độ muối KCl cao cũng nâng cao tính tan của protein trong quá trình tinh sạch, thể hiện qua sự đồng đều và tính đối xứng trên sắc ký đồ. Kết hợp các ưu điểm của GFP và nồng độ muối KCl cao có thể cho phép việc tổng hợp được protein hnRNPK trong phòng thí nghiệm được thuận tiện hơn nhằm phục vụ cho các bước nghiên cứu tiếp theo của protein này trong tương lai.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP:

2.1. Vật liệu:

Dung dịch đệm kết dính : Hepes 50mM, KCl 2M, Imidazole 20mM, glycerol 10%, pH 7.4

Dung dịch đệm rửa giải: Hepes 50mM, KCl 2M, Imidazole 300mM, glycerol 10%, pH 7.4

Dung dịch đệm lọc ly giải và sắc ký lọc gel: Hepes 50mM, KCl 0,3M, pH 7.4

Gen hnRNPK được sử dụng trong nghiên cứu này theo trình tự gen từ Uniprot entry HNRNPK_HUMAN. Plasmids pETM11 chứa gen tái tổ hợp 6xHis-eGFP-hnRNPK, với vị trí cắt của protein Tobacco etch virus (TEV) ở giữa gen 6xHis-eGFP và gen hnRNPK.

Kháng sinh: Kanamycin, và Chloramphenicol.

2.2. Phương pháp:

2.2.1. Biểu hiện protein và ly giải tế bào:

Tế bào E.coli Rosetta 2(DE3) có chứa plasmid với gen hnRNPK được nuôi trong môi trường LB với các loại kháng sinh tương ứng để biểu hiện protein dưới tác động của IPTG ở nhiệt độ 25°C. Mẫu tế bào E.coli sau khi được biểu hiện protein sẽ thông qua ly tâm để thu cặn tế bào và lưu trong nhiệt độ -20°C cho bước thí nghiệm tiếp theo là tinh sạch protein.

Cặn tế bào chứa protein hnRNPK được rửa đông và hòa tan lại trong 40ml dung dịch đệm liên kết, chứa 1mM DTT và 15 µg/ml Dnase để ngăn sự hình thành phức hợp sau bước ly giải tế bào.

Ly giải tế bào được thực hiện bằng máy siêu âm, tiếp đến protein được tách ra bằng cách ly tâm ở tốc độ 24000xg trong 45 phút ở 4°C.

2.2.2. Sắc ký ái lực Niken (Ni-Immobilized metal affinity chromatography):

Lần 1: Dịch nổi chứa protein hnRNPK sẽ được lọc qua màng lọc 0,22 µm. Cân bằng cột 5ml Ni với nước và đệm liên kết tương ứng với 4 thể tích cột. Các phân đoạn chứa GFP-hnRNPK đã được thu lại. 10 µl trong phân đoạn quan trọng được thu lại để chạy gel sau này nhằm đánh giá chất lượng protein. Tất cả các phân đoạn protein đạt tiêu chuẩn sẽ được thu và trộn lại với nhau, sau đó đo nồng độ protein bằng nanodrop để theo dõi tổng lượng protein sau thí nghiệm sắc ký ái lực Niken.

Lần 2 (rIMAC): Protein hnRNPK sau khi được phân cắt bởi TEV sẽ được chạy lại qua cột Niken để tách hnRNPK và 6xHis-eGFP. Cột sau đó được rửa bằng dung dịch đệm thẩm tích cho đến khi độ hấp thụ đạt 0, và dòng chảy qua chứa protein hnRNPK được thu lại. Protein hnRNPK được cô đặc bằng cách ly tâm với tốc độ 3000xg trong 15 phút mỗi lần (trộn đều sau mỗi lần ly tâm để tránh kết tủa) cho đến khi nồng độ đạt 20 mg/ml.

2.2.3. Thí nghiệm cắt bởi TEV protease:

Protease TEV được thêm vào phần dịch nổi chứa protein sau bước tinh sạch bằng sắc ký ái lực Niken theo tỷ lệ khối lượng protein là 20:1 (protein:TEV). hnRNPK có bổ sung TEV protease được chuyển vào bên trong màng thẩm tích đã rửa sạch. Quá trình thẩm tích được diễn ra ở nhiệt độ 4°C qua đêm để loại bỏ Imidazole, hạ thấp nồng độ muối KCl và cho phép TEV protease cắt rời 6xHis-eGFP ra khỏi protein hnRNPK.

2.2.4. Sắc ký lọc gel (SEC):

Trong phương pháp sắc ký lọc gel, pha tĩnh là các vật chất nằm trong lỗ của

các hạt sắc ký, trong khi dung môi tự do là pha động. Sắc ký lọc gel tách riêng từng đơn chất trong một hợp chất dựa vào kích thước và cấu hình khác nhau của các đơn chất. Thêm vào đó, kích cỡ khác nhau của các lỗ trên bề mặt hạt sắc ký cũng cho phép phân tách được các hạt protein với thể tích khác nhau. Các phân tử lớn hơn kích thước lỗ rỗng sẽ không thể xâm nhập vào lỗ rỗng và sẽ di chuyển ra khỏi cột theo dòng dung môi pha động. Trong khi đó, các phân tử nhỏ hơn kích thước lỗ rỗng sẽ bị giữ bên trong các lỗ rỗng và bị rửa giải ra khỏi cột muộn hơn so với các phân tử lớn. Từ đó, các thành phần khác nhau của hỗn hợp sẽ được tách ra khỏi cột theo trình tự từ phân tử lớn đi ra khỏi cột trước, sau đó là phân tử nhỏ.

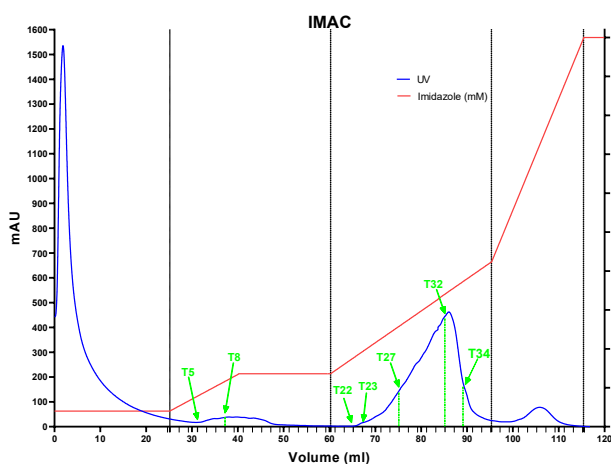
Chuẩn bị cột SEC S200 16/60 được cân bằng ở nhiệt độ 4°C bằng 2 lần thể tích cột (CV) nước và 2 CV đệm SEC

tương đương 240 mL. Protein hnRNPK được phân tách theo kích thước trong 1 CV ở tốc độ 1 mL/phút. Các phân đoạn được thu thập giữa 40-100 mL, các phân đoạn tiêu biểu sẽ được chạy điện di để đánh giá mức độ tinh sạch của protein ở từng phân đoạn. Protein hnRNPK sau khi tinh sạch sẽ được thu và cô lại cho đến khi nồng độ đạt 20mg/ml. Sau đó protein được đông lạnh nhanh bằng nitơ lỏng thành ở dạng 50 µL dịch chiết trước khi lưu trữ ở nhiệt độ -80°C.

3. Kết quả:

3.1. Sắc ký ái lực Nikel:

Dung dịch chứa protein GFP-hnRNPK được chạy qua cột sắc ký ái lực Nikel nhằm bước đầu phân tách protein mục tiêu hnRNPK ra khỏi các thành phần tạp chất khác. Hình ảnh sắc ký đồ cho thấy các thành phần khác nhau được rửa giải ra khỏi cột sắc ký (Hình 1a).



(a)



(b)

Hình 1.

(a) Sắc ký đồ của dung dịch hnRNPK từ phương pháp sắc ký ái lực Nikel.

A: Phân đoạn sắc ký trước khi tăng nồng độ Imidazole. B: Phân đoạn sắc ký tăng và duy trì nồng độ Imidazole ở mức

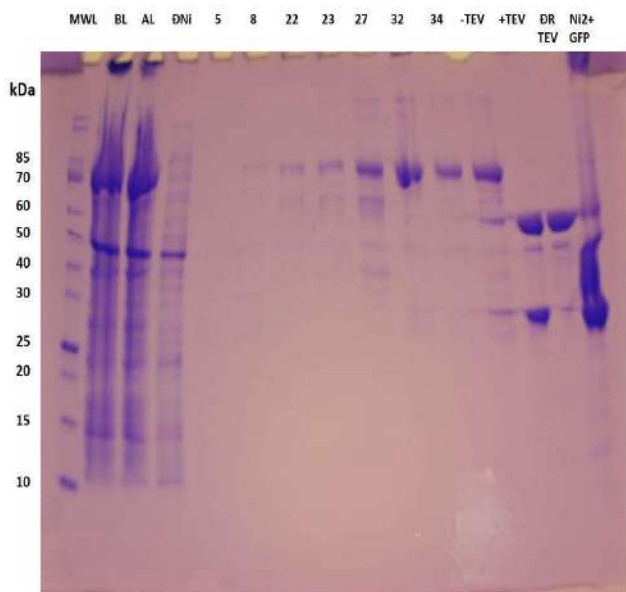
10%. C: Phân đoạn sắc ký khi tăng nồng độ Imidazole từ 10% đến ~ 40%. D: Phân đoạn sắc ký khi tăng nồng độ Imidazole đến 100%. Trục tung trái biểu thị khả năng hấp thụ UV với đơn vị là

mAU (mili absorbance unit). Trục tung phải biểu thị nồng độ Imidazole trong thời gian chạy sắc ký. Trục hoành biểu thị thể tích dung dịch được rửa ra khỏi cột. Các phân đoạn nhỏ được ký hiệu tương ứng trên trục hoành là biểu thị các phân đoạn nhỏ trong quá trình sắc ký để thu mẫu và phân tích.

(b) Hình ảnh một phân đoạn protein GFP-hnRNPK thu được từ phương pháp sắc ký ái lực Niken.

Phân đoạn A ứng với thời điểm dung dịch đệm sắc ký chỉ chứa nồng độ Imidazole rất thấp là 20mM để rửa giải các tạp chất gắn với cột bởi những liên kết không đặc hiệu. Khoảng này xuất hiện đỉnh hấp thụ UV đầu tiên, xuất phát từ hơn 1500 mAU sau đó nhanh chóng hạ xuống dưới 100 mAU trong chưa đầy 20ml. Mẫu thu được trong các phân đoạn này không có màu xanh đặc trưng của GFP. Điều này cho thấy phân đoạn A này chứa các tạp chất liên kết không đặc hiệu với cột sắc ký Niken và đã bị loại bỏ ra khỏi cột với nồng độ Imidazole thấp. Trong phân đoạn B, nồng độ Imidazole trong dung dịch đệm

tăng dần lên và duy trì ở 100mM. Thời điểm này xuất hiện đỉnh hấp thụ UV thứ hai với chỉ số hấp thụ UV thấp ở 50 mAU rồi hạ xuống ở cận giá trị 0. Điều đó thể hiện rằng dung dịch đệm với nồng độ 10% Imidazole có thể loại bỏ các phân tử liên kết không đặc hiệu với Niken ra khỏi cột. Phân đoạn C là giai đoạn rửa giải, khi nồng độ Imidazole tăng từ 10% đến ~ 40% .Tại giai đoạn này, nồng độ Imidazole tăng mạnh để tách GFP-HNRNP K chứa His Tag ra khỏi dung dịch. Các phân đoạn protein GFP-hnRNPK được rửa giải có màu xanh đặc trưng của GFP (Hình 1b). Cụ thể, giá trị hấp thụ UV tăng lên tỉ lệ thuận với sự gia tăng nồng độ Imidazole cho đến khi gần đạt đỉnh giá trị 500 mAU rồi lại giảm xuống gần 50 mAU. Phân đoạn D ứng với thời điểm khi nồng độ Imidazole tiếp tục tăng lên, ta thấy thể tích dung dịch đệm trong khoảng 100 – 110 ml, giá trị hấp thụ UV tăng lên khoảng 100 mAU. Đây là phân đoạn loại bỏ những tạp chất còn lưu lại ra khỏi cột.



Hình 2. Sắc ký đồ SDS-PAGE qua sắc ký ái lực nikel.

MWL: Thang đo điện di protein chuẩn;
BL: trước khi ly giải tế bào; AL: sau khi

ly giải tế bào; ĐNi: Đệm rửa từ NIMAC;
5, 8, 22, 23, 27, 32, 34: các phân đoạn

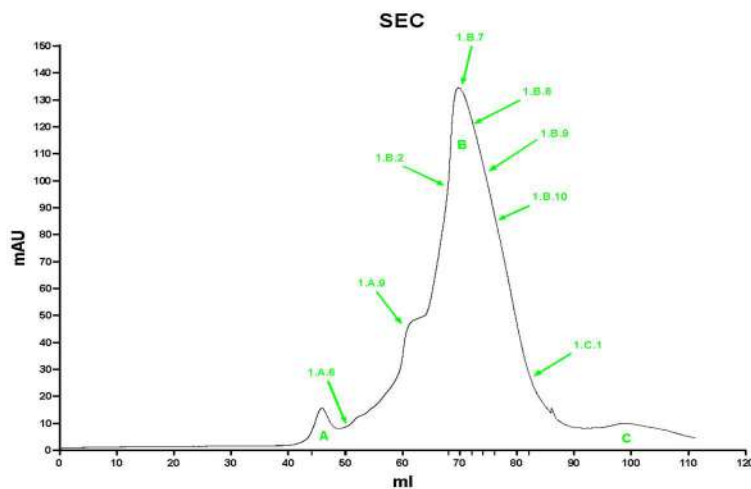
tương ứng trong sắc ký đồ IMAC; -TEV: Trước khi cắt với TEV protease; +TEV: Sau khi cắt với TEV protease; ĐR TEV: Hình 2 cho thấy kết quả điện di SDS-PAGE với các dải protein đã được tinh sạch ở những thời điểm khác nhau. Cột BL và AL biểu thị kết quả hnRNPK - GFP được thể hiện qua hai vạch dày ở vị trí 50-85 kDa. Kết quả biểu hiện rằng trước khi ly giải tế bào bằng siêu âm, SDS đã phá hủy màng tế bào dẫn đến các protein được giải phóng ra ngoài và có nhiều vạch trải dài dọc gel điện di. Ở cột 5 và 8 biểu thị hai phân đoạn tương ứng với phân đoạn B của sắc ký đồ. Có thể thấy dải protein mờ ở vị trí dưới 85 kDa (tương ứng với GFP-hnRNPK) ở cột 8, cho thấy một lượng nhỏ GFP-hnRNPK cùng với các protein tạp đã bị rửa giải ra khỏi cột Niken ở nồng độ Imidazole 20mM và các protein có liên kết không đặc hiệu với Niken bị loại bỏ với nồng độ Imidazole khi tăng lên 68mM. Ở các cột 22, 23, 27, 32, 34 biểu thị quá trình đệm rửa tương ứng với phân đoạn C trong hình 1. Trong khoảng tăng nồng độ Imidazole lên từ 68mM đến 260mM, các phân đoạn protein ở đỉnh cột rửa giải số 32 và 34

đệm rửa chứa hnRNPK khi thực hiện; rIMAC; Ni²⁺ GFP: đệm rửa cột NIMAC chứa GFP.

có độ tinh sạch cao. Trước khi cắt bằng TEV protease, dải băng biểu thị protein GFP-hnRNPK xuất hiện đậm và rất rõ ràng ở vị trí dưới thang 85 kDa. Sau khi cắt với TEV protease, dải băng đậm này biến mất và tách làm hai băng ở vị trí khối lượng riêng nhỏ hơn là trên 50 kDa và hơn 25 kDa, tương ứng với hnRNPK và GFP. Điều này cho thấy TEV đã cắt hoàn toàn GFP ra khỏi hnRNPK với hiệu suất cao. Sau khi cắt protein bởi TEV protease, toàn bộ mẫu protein được chạy qua cột sắc ký ái lực Ni một lần nữa, và protein GFP có His-tag bị giữ lại ở cột sắc ký. Mẫu protein hnRNPK thu được sau khi chạy qua cột sắc ký lần thứ hai đã loại bỏ được GFP và các thành phần protein tạp khác (phân đoạn ĐR TEV).

3.2 Sắc ký lọc gel

Protein hnRNPK sau khi được tinh sạch bước đầu bởi phương pháp sắc ký ái lực Ni, sẽ tiếp tục được tinh sạch bởi phương pháp thứ hai là sắc ký lọc gel để nâng cao mức độ tinh sạch của sản phẩm protein cuối cùng.



Hình 3. Sắc ký đồ của protein hnRNPK đã qua xử lý bằng phương pháp sắc ký lọc gel trên cột gel S200 16/60 SEC tại bước sóng 280nm.

Trục hoành thể hiện thể tích dung dịch đệm (SEC) tăng dần theo thời gian.

Trục tung thể hiện giá trị hấp thụ UV của protein trong dung dịch trong quá trình

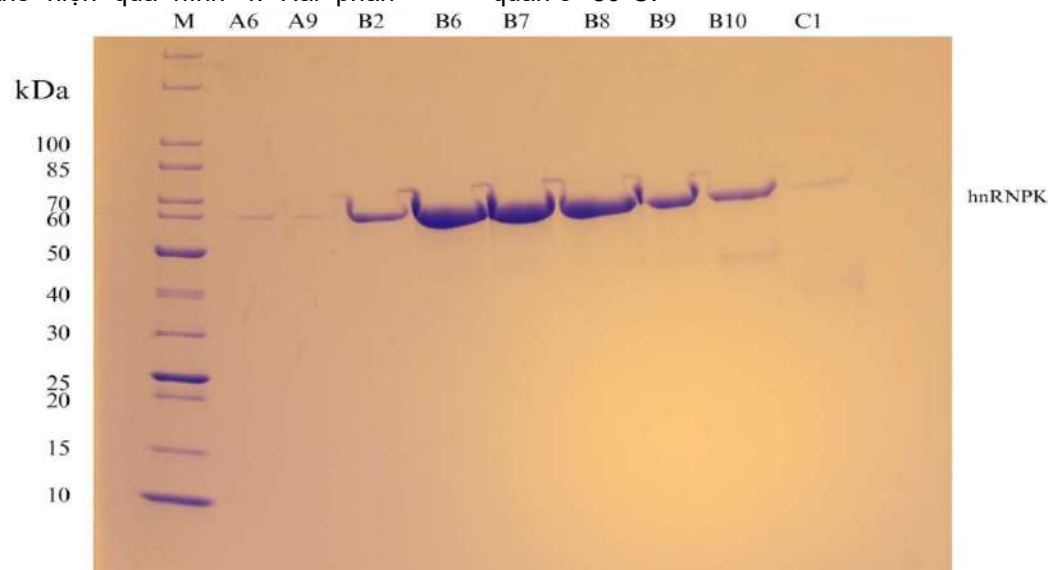
chạy sắc ký. Phân đoạn A: phân đoạn tập trung của các protein đi ra khỏi cột sớm hơn. Phân đoạn B: phân đoạn tập trung chính của protein hnRNPK trong mẫu. Phân đoạn C: phân đoạn tập trung

Phân đoạn A có sự xuất hiện của protein có thể là dạng đa phân của hnRNPK, phân đoạn B có protein hnRNPK chiếm phần lớn trong mẫu, phân đoạn C có sự xuất hiện của các protein ở kích thước nhỏ hơn (Hình 3). Phân đoạn B là đỉnh mẫu chính trong sắc ký đồ hình 3. Cột tín hiệu hấp thụ ở đạt hơn 130 mAU. Tuy nhiên, cột sắc ký đồ của phân đoạn B không có tính đối xứng cao, cũng như có sự xuất hiện của các đỉnh phụ nhỏ như ở vị trí phân đoạn A9. Điều này cho thấy có sự không đồng đều nhất định của mẫu protein hnRNPK ngay cả khi duy trì toàn bộ thí nghiệm ở 4°C.

Kết quả trên cho thấy mức độ cần thiết của bước tinh sạch thứ hai sử dụng sắc ký lọc gel (SEC) để đảm bảo thu được protein hnRNPK ở dạng đơn phân có độ tinh sạch cao. Các phân đoạn nhỏ được đem đi kiểm tra bằng phương pháp điện di SDS-PAGE. Độ tinh khiết của các phân đoạn protein được thể hiện qua hình 4. Hai phân

của các protein đi ra khỏi cột muộn hơn. Các phân đoạn nhỏ của 3 phân đoạn A, B, C được ký hiệu tương ứng trên đồ thị.

đoạn A6 và A9 cho thấy một lượng rất ít protein hnRNPK thể hiện qua độ nhạt của hai dải băng điện di trên gel SDS-PAGE. Các phân đoạn từ B2 đến B10 cho thấy lượng protein tăng dần của hnRNPK trong mẫu, với độ đậm đạt cao nhất ở B6, B7 và B8. Các phân đoạn tiếp theo, B9 và B10, bắt đầu có sự xuất hiện của các băng điện di mờ ở giữa mức 40-50 kDa và nhỏ hơn, cho thấy sự tạp nhiễm đã xuất hiện ở hai phân đoạn này. Phân đoạn C1 chỉ có một dải rất mờ ở vị trí của protein hnRNPK, cho thấy nồng độ hnRNPK đã giảm xuống rất thấp và đi kèm với sự tạp nhiễm của các protein khác. Những quan sát trên cho thấy rằng các phân đoạn B6, B7, B8 là những phân đoạn tốt nhất để thu mẫu protein hnRNPK nhằm đảm bảo độ tinh sạch cao nhất. Sau khi thu mẫu protein từ ba phân đoạn B6, B7, và B8, protein được cô đặc đến nồng độ 20 mg/ml, sau đó được đông lạnh nhanh trong ni tơ lỏng với thể tích 50 µl trước khi bảo quản ở -80°C.



Hình 4. Hình ảnh protein gel SDS-PAGE của các phân đoạn protein hnRNPK sau khi hoàn thành thí nghiệm sắc ký lọc gel (SEC) với cột Superdex S200 16/60.

M: thang protein chuẩn. A6, A9, B2, B6, B7, B8, B9, B10 và C1 là các phân đoạn

4. THẢO LUẬN:

Trong quá trình tinh sạch protein, sự lắng tủa của protein không dễ dàng có thể quan sát thấy, và có thể ảnh hưởng đến chất lượng cuối cùng của protein. Để giải quyết vấn đề này, cDNA của hnRNPK đã được gắn tag GFP (Histag-GFP-hnRNPK), cho phép protein được biểu hiện ra có khả năng phát huỳnh quang màu xanh lục (9). Từ đó, giúp cho việc theo dõi sự lắng tủa và tính tan của protein trong quá trình tinh sạch trở nên dễ dàng hơn, đồng thời đảm bảo chất lượng của protein trong quá trình thí nghiệm.

Những nghiên cứu trước đây đã cho thấy sự kết tủa rất nhanh của protein hnRNPK trong điều kiện thí nghiệm với nồng độ muối KCl thấp (50 mM KCl) trong dung dịch đệm, khi nâng nồng độ muối lên dần thì tốc độ kết tủa của protein cũng chậm lại và dừng lại hoàn toàn ở nồng độ 500 mM KCl (4). Trong nghiên cứu này, nồng độ muối KCl trong dung dịch đệm đã được tăng lên đến 2M để giới hạn tối đa sự kết tủa của protein hnRNPK trong giai đoạn tinh sạch bằng sắc ký ái lực Niken. Phân đoạn A của kết quả sắc ký ái lực Niken (Hình 1a) cho thấy tại thời điểm ban đầu, ngay sau khi phá vỡ màng tế bào E.coli và ly tâm, mẫu protein hnRNPK vẫn còn lẫn lượng lớn tạp chất thể hiện ở cột tín hiệu hấp thụ UV lớn đầu tiên ở phân đoạn A. Sau khi những tạp chất này được rửa giải khỏi cột sắc ký ái lực trong phân đoạn A và B, sản phẩm protein thu được ở phân đoạn C là protein Histag-GFP-hnRNPK màu xanh lục trong suốt, không có dấu hiệu vẩn đục của kết tủa protein (Hình 1b). Sắc ký đồ của thí nghiệm sắc ký lọc gel cũng cho thấy sự đồng đều tương đối cao ở hai nửa đỉnh sắc ký đồ (Hình 3). Các kết quả này cho thấy dưới tác động của GFP, và nồng độ muối cao (2M) ở thời điểm ban đầu, protein hnRNPK thu

nhỏ tương ứng trong sắc ký đồ (hình 3).

được sau quá trình tổng hợp và tinh sạch có tính tan tốt và đồng đều trong dung dịch đệm.

5. KẾT LUẬN:

Trong nghiên cứu này, việc sử dụng kỹ thuật sắc ký ái lực Niken kết hợp cùng sắc ký lọc gel đã được nghiên cứu để tinh sạch protein hnRNPK. Kết quả cho thấy có thể hoàn toàn sử dụng quy trình trên để thu được protein hnRNPK tinh sạch. Cùng kỹ thuật sắc ký lọc gel, chất lượng sản phẩm protein thu được tăng lên đáp ứng được các yêu cầu chất lượng cao đối với mẫu đầu vào cho các nghiên cứu về protein hnRNPK tiếp theo. Tuy nhiên, trong quá trình thao tác thí nghiệm cũng có những hạn chế, như khó khăn trong việc phải duy trì nhiệt độ liên tục ở 4°C để hạn chế sự biến tính của protein nhằm đạt được chất lượng tốt nhất cho sản phẩm protein cuối cùng.

6. ĐỊNH HƯỚNG TƯƠNG LAI:

Hiệu quả giải quyết vấn đề kết tủa của protein hnRNPK tại nồng độ muối KCl 2M đã được khẳng định từ đề tài này, tuy nhiên từ kết quả sắc ký đồ (hình 3) vẫn có sự xuất hiện của các phân tử có khối lượng lớn, cho thấy nồng độ muối cao vẫn chưa ngăn chặn được hoàn toàn sự kết tủa của protein. Trong tương lai, hướng nghiên cứu sử dụng các chất ổn định có thể ngăn chặn tốt hơn sự kết tủa của protein hnRNPK. Các chất này có thể bao gồm các chất chống kết tủa, các chất ổn định protein, hoặc các chất làm giảm độ nhớt của dung dịch. Các chất chống kết tủa có thể giúp ngăn chặn quá trình kết tủa bằng cách tạo ra một môi trường bất lợi cho quá trình hình thành kết tủa diễn ra. Các chất ổn định protein có thể giữ được dạng đơn phân cho protein hnRNPK trong dung dịch và ngăn chặn sự kết tủa. Các chất làm giảm độ nhớt của dung dịch có thể giúp giảm sự tương tác giữa các phân tử protein, từ đó ngăn chặn sự hình

thành các khối kết tủa (4). Việc sử dụng các chất ổn định này có thể cải thiện khả năng ngăn chặn kết tủa của protein

hnRNPK để đạt được hiệu quả tinh sạch tốt nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Wang Z, Qiu H, He J, Liu L, Xue W, Fox A, et al. The emerging roles of hnRNPK. *Journal of Cellular Physiology*. 2019;235.
2. Mucha B, Qie S, Bajpai S, Tarallo V, Diehl JN, Tedeschi F, et al. Tumor suppressor mediated ubiquitylation of hnRNPK is a barrier to oncogenic translation. *Nat Commun*. 2022;13(1):6614.
3. Xu Y, Li R, Zhang K, Wu W, Wang S, Zhang P, et al. The multifunctional RNA-binding protein hnRNPK is critical for the proliferation and differentiation of myoblasts. *BMB Rep*. 2018;51(7):350-5.
4. Moritz B, Lilie H, Naarmann-de Vries IS, Urlaub H, Wahle E, Ostareck-Lederer A, et al. Biophysical and biochemical analysis of hnRNP K: arginine methylation, reversible aggregation and combinatorial binding to nucleic acids. *Biol Chem*. 2014;395(7-8):837-53.
5. Leopoldino AM, Carregaro F, Silva CH, Feitosa O, Mancini UM, Freitas JM, et al. Sequence and transcriptional study of HNRPK pseudogenes, and expression and molecular modeling analysis of hnRNP K isoforms. *Genome*. 2007;50(5):451-62.
6. Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE, Corbett AH. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem*. 2007;282(8):5101-5.
7. Chan JY, Huang SM, Liu ST, Huang CH. The transactivation domain of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K overlaps its nuclear shuttling domain. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(10):2078-89.
8. Barondeau DP, Putnam CD, Kassmann CJ, Tainer JA, Getzoff ED. Mechanism and energetics of green fluorescent protein chromophore synthesis revealed by trapped intermediate structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(21):12111-6.
9. Su WW. Fluorescent proteins as tools to aid protein production. *Microb Cell Fact*. 2005;4(1):12.
10. Cormack B. Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi. *Curr Opin Microbiol*. 1998;1(4):406-10.

RESEARCH ON PURIFYING hnRNP K PROTEIN USING CHROMATOGRAPHY

**Le Quang Dung^{1*}, Vu Thi Minh Chau¹, Nguyen Trung Kien¹,
Pham Van Tra¹, Bui Thi Van Khanh¹**

¹Department of Biology, University of Natural Sciences, Hanoi National University

ABSTRACT

The hnRNP K protein plays a crucial role in DNA/RNA binding, engaging in nucleic acid interactions and exerting significant influence over cellular biological processes. Aberrations in hnRNP K expression have been closely associated with the development of various cancer types. Consequently, there is a pressing need to efficiently express and purify hnRNP K protein in substantial quantities to facilitate comprehensive investigations centered on this protein. However, challenges arise during protein purification due to hnRNP K's propensity for instability and aggregation, which pose significant hurdles in research endeavors. To overcome these obstacles, the study employs an optimized purification approach involving elevated potassium chloride (KCl) concentrations. This strategic KCl elevation is supplemented by the use of Green Fluorescent Protein (GFP) to enhance the purification process. GFP serves as a valuable tool for real-time monitoring of protein quality during purification, and the increased KCl concentrations in buffers effectively prevent premature hnRNP K protein precipitation. The integration of Nickel-affinity Chromatography and gel filtration chromatography offers the potential to achieve high-purity separation of hnRNP K protein. However, for comprehensive investigations into hnRNP K's structure and function, the final KCl salt concentration is lowered to a physiological level of 300 mM KCl. The reduction of KCl concentrations leads to challenges in maintaining the inherent stability of hnRNP K protein. Hence, future inquiries may explore alternative methodologies to mitigate hnRNP K protein precipitation.

Keywords: hnRNP K, aggregate, Ni affinity chromatography, gel-filtration chromatography, monomeric state