

Biểu hiện nội bào và khảo sát khả năng tinh chế protein tái tổ hợp trong *Bacillus subtilis* sử dụng chỉ thị GFP

• Phan Thị Phượng Trang

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 26 tháng 12 năm 2014, nhận đăng ngày 03 tháng 08 năm 2015)

TÓM TẮT

Bacillus subtilis và *Escherichia coli* là hai mô hình nghiên cứu đối với vi khuẩn Gram dương và Gram âm, đồng thời cũng là hai hệ thống vi khuẩn được sử dụng nhiều trong lĩnh vực công nghệ protein tái tổ hợp. So với *E. coli*, *B. subtilis* tuy có nhiều ưu điểm hơn, nhất là không lẫn nội độc tố trong sản phẩm, nhưng các nghiên cứu cũng như công nghệ nền phục vụ việc biểu hiện và tinh chế protein tái tổ hợp ở vi khuẩn Gram dương này vẫn chưa được quan tâm rộng rãi. Một số nghiên cứu trước đây đã phát triển thành công hệ thống vector pHT cho phép biểu hiện protein tái tổ hợp trong *B. subtilis* một cách hiệu quả nhưng vẫn chưa tiến hành tinh chế và thu nhận protein mục tiêu. Ở nghiên cứu này, chúng tôi tiếp tục sử dụng hệ thống pHT trong *B. subtilis* để đánh giá khả năng biểu hiện nội bào của protein chỉ thị GFP sau khi đã dung hợp với một đuôi tinh chế, đồng thời thử nghiệm khả năng tinh chế protein mục tiêu. Vector biểu hiện được

thiết kế mang gen *gfp* dung hợp với vùng gen mã hóa đầu N của protein LysS (LysSN), đuôi His-tag và vị trí nhận biết đặc hiệu của TEV protease nhằm tăng cường khả năng biểu hiện protein mục tiêu cũng như giúp tinh chế và cắt bỏ đuôi dung hợp. Kết quả cho thấy vector này cho phép biểu hiện hiệu quả protein dung hợp LysSN-6xHis-TEV-GFP trong *B. subtilis*, protein mục tiêu có thể được tinh chế thông qua cột Ni^{2+} , đuôi dung hợp có khả năng được cắt bỏ hoàn toàn bởi TEV protease. Phân đoạn protein sau khi tinh sạch được xác định khối lượng phân tử bằng phân tích LC-MS cho thấy GFP tái tổ hợp đã được cắt bỏ đuôi dung hợp một cách chính xác và được thu nhận với độ tinh sạch cao. Nghiên cứu này cho thấy tiềm năng của việc ứng dụng hệ thống vector pHT và chủng chủ an toàn *B. subtilis* để biểu hiện nội bào và tinh chế protein tái tổ hợp.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, LysSN, GFP, hệ thống biểu hiện pHT, sắc kí ái lực.

GIỚI THIỆU

Sự bùng nổ trong lĩnh vực nghiên cứu và phát triển vaccine cũng như protein trị liệu trong những năm gần đây đòi hỏi một hệ thống biểu hiện và tinh chế protein tái tổ hợp thật sự hiệu quả, sản phẩm phải có tính an toàn và độ tinh sạch cao. Trong đó, yếu tố quyết định cho việc

biểu hiện thành công một protein mục tiêu là sự phù hợp giữa đặc tính của protein với vật chủ biểu hiện cũng như quy trình công nghệ kèm theo [2]. *Escherichia coli* và một số chủng *Bacillus* là những vật chủ prokaryote phổ biến trong công nghiệp sản xuất protein tái tổ hợp do có ưu điểm

tăng trưởng nhanh, mật độ tế bào lớn, môi trường nuôi cấy rẻ tiền và thao tác nuôi cấy đơn giản. Trong đó, *E. coli* vẫn được sử dụng thường xuyên nhất cho đến nay do hệ thống vector đã được phát triển khá đa dạng, trang thiết bị hỗ trợ đầy đủ, các quy trình kỹ thuật đã được tối ưu với độ tin cậy cao và được áp dụng rộng rãi [1]. Tuy nhiên, *E. coli* vẫn tồn tại một số hạn chế về chất lượng cũng như tính an toàn của sản phẩm. Do là vi khuẩn Gram âm nên màng ngoài của tế bào *E. coli* chứa nhiều lipopolysaccharide (LPS), hay còn được gọi là nội độc tố, có khả năng gây sốt cao ở người và động vật. Những phân tử nội độc tố này cần được loại bỏ hoàn toàn khỏi sản phẩm, do đó quy trình tinh sạch protein mục tiêu trở nên phức tạp và khó khăn [3]. Khác với *E. coli*, *Bacillus subtilis* là vi khuẩn Gram dương thuộc nhóm vi khuẩn an toàn GRAS (*generally recognized as safe*), màng ngoài không chứa LPS nên quy trình tinh sạch sản phẩm đơn giản hơn. Bên cạnh đó, hệ thống vector cho phép biểu hiện protein trong *B. subtilis* cũng đã được phát triển đầy đủ trong những năm gần đây với nhiều chiến lược biểu hiện và mức độ biểu hiện khác nhau [4], [5]. Vì vậy, *B. subtilis* trở thành vật chủ tiềm năng trong công nghiệp protein tái tổ hợp. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng GFP (Green-fluorescent protein) làm protein chỉ thị để biểu hiện nội bào trong *B. subtilis* sau khi đã dung hợp với một đuôi tinh chế chứa His-tag, đồng thời đánh giá khả năng được tinh chế của protein mục tiêu này thông qua sắc ký ái lực với cột Ni²⁺.

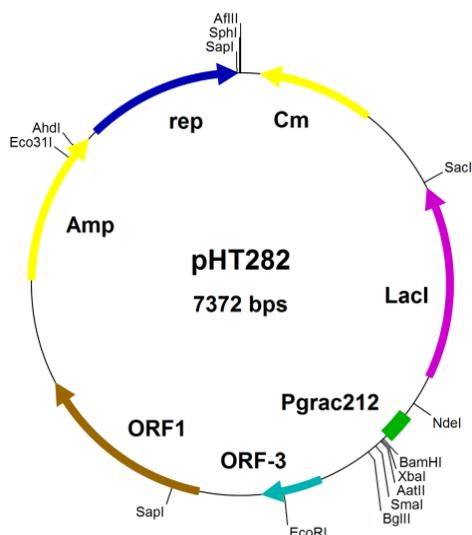
GFP là protein phát huỳnh quang được tìm thấy ở loài sứa biển *Aequorea victoria*. Protein này phát ra ánh sáng màu xanh lục mà mắt thường có thể nhìn thấy sau khi tiếp nhận nguồn ánh sáng kích thích có bước sóng ngắn như tia UV. Đồng thời, hoạt tính phát quang của GFP không cần cơ chất cũng như co-factor; việc dung hợp không làm ảnh hưởng đến cấu trúc, chức năng và sự định vị của protein mục tiêu; có thể được biểu hiện trong nhiều vật chủ khác nhau.

Điều này khiến GFP trở thành công cụ chỉ thị tốt trong các nghiên cứu cơ bản cũng như kiểm soát và theo dõi các quy trình công nghệ sinh học [7]. Cụ thể trong nghiên cứu này, GFP được sử dụng để đánh giá khả năng biểu hiện và tinh chế protein tái tổ hợp trong *B. subtilis*. Gen *gfp* được tạo dòng vào vector cho phép biểu hiện nội bào ở dạng dung hợp với đuôi LysSN-6xHis-TEV; sự biểu hiện có thể được quan sát bằng mắt thường thông qua sự thay đổi màu của dịch nuôi cấy vi khuẩn trước và sau khi cảm ứng, sau đó được kiểm tra lại bằng SDS-PAGE; việc tinh chế protein mục tiêu và cắt bỏ đuôi dung hợp cũng được quan sát thông qua so sánh màu sắc của các phân đoạn protein thu được qua từng bước thí nghiệm và điện di kiểm tra. Cuối cùng, protein sau khi thu nhận được phân tích LC-MS nhằm xác định khối lượng phân tử, từ đó kết luận việc cắt loại bỏ đuôi dung hợp đã diễn ra một cách chính xác và protein mục tiêu được thu nhận thành công.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

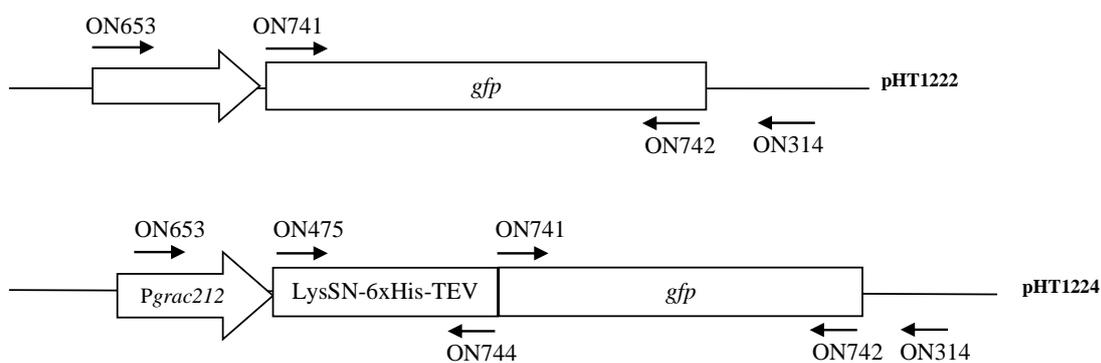
Plasmid pHT10- *gfp*+ Δ *Bam*HI, pHT364 và pHT282 được cung cấp bởi Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM. Các enzyme *Pfu* DNA polymerase, *Taq* DNA polymerase và các enzyme cắt giới hạn bao gồm *Aat*II, *Bam*HI, *Sma*I được cung cấp bởi công ty Thermo Scientific. Các bộ kit và hóa chất cơ bản dùng trong nghiên cứu sinh học phân tử và nuôi cấy vi sinh được cung cấp bởi các công ty Qiagen, GE healthcare, Thermo Scientific, Sigma-Aldrich, Merck-Millipore và BioBasic. Trong đó, pHT10-*gfp*+ Δ *Bam*HI mang gen *gfp*, pHT364 mang gen mã hóa đuôi dung hợp LysSN-6xHis-TEV và pHT282 là plasmid gốc để tạo dòng vector biểu hiện. Sơ đồ plasmid pHT282 được thể hiện trong Hình 1. Chúng vi sinh vật gồm *E. coli* OmniMAXTM (Invitrogen) và *B. subtilis* 1012 [6].



Hình 1. Sơ đồ plasmid pHT282

Bảng 1. Các mồi cho các phản ứng PCR được thực hiện trong nghiên cứu này

Tên mồi	Trình tự
ON741	5'-CCATGTCTAGAGTCGACGTCGCTAGCAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGG-3'
ON742	5'-TAGGCGGGCTGCCCCGGGTTATTTGTAGAGCTCATCCATGCCATGTG-3'
ON314	5'-TGTTTCAACCATTTGTTCCAGGT-3'
ON475	5'-AAAGGAGGAAGGATCTATGAGTCAAGAAGAAC-3'
ON744	5'-TCTCCTTTGCTAGCGACGTCGACTCTAGAACCGGATCCC-3'
ON653	5'-ACCGGAATTAGCTTGGTACCAGCTATTG-3'



Hình 2. Sơ đồ vị trí các mồi cho phản ứng PCR

Các mồi cho phản ứng PCR được tổng hợp bởi công ty MacroGen Inc được trình bày trong

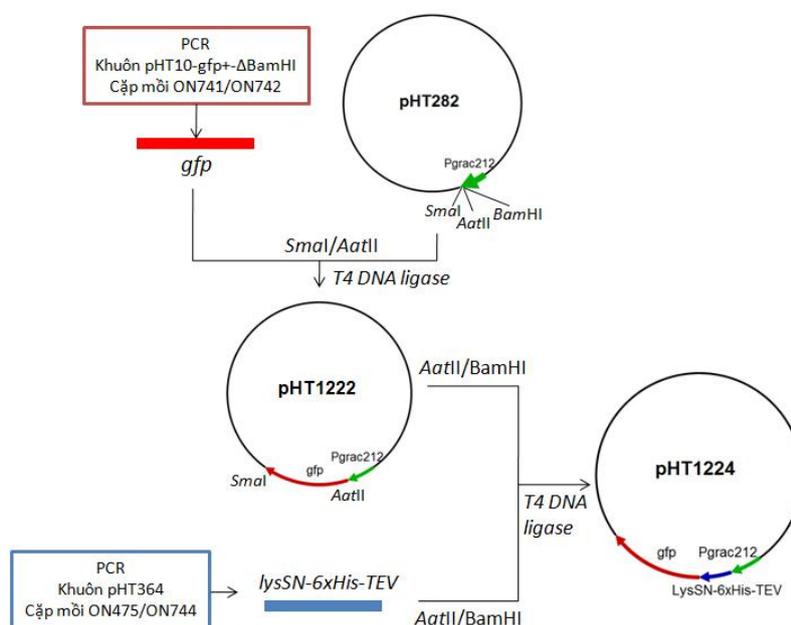
Phương pháp

Tạo dòng vector pHT1224

Vector pHT1224 được tạo thành từ việc chèn gen *gfp* và gen mã hóa đuôi dung hợp LysSN-6xHis-TEV vào plasmid pHT282 (Hình 1). Đầu tiên, plasmid pHT282 và gen *gfp* sau khi được thu nhận trong phản ứng PCR với khuôn là plasmid pHT10-*gfp*+ Δ BamHI và cặp mồi đặc hiệu ON741/ON742 sẽ được xử lý bởi 2 enzyme cắt giới hạn *Aat*II/*Sma*I và nối với nhau bằng T4 DNA ligase để tạo thành vector pHT1222, trong

Bảng 1 và sơ đồ các mồi được thể hiện trong Hình 2.

đó gen *gfp* nằm ngay sau trình tự promoter *Pgrac*212. Sau đó, gen mã hóa đuôi dung hợp LysSN-6xHis-TEV, được thu nhận thông qua phản ứng PCR với khuôn là plasmid pHT364 và cặp mồi đặc hiệu ON475/ON744, được chèn vào vector pHT1222 sau promoter *Pgrac*212 và trước gen *gfp* bởi 2 enzyme cắt giới hạn *Aat*II/*Bam*HI và enzyme nối T4 DNA ligase, tạo thành vector tái tổ hợp pHT1224. Sơ đồ tóm tắt quy trình tạo dòng vector pHT1224 được thể hiện trong Hình 3.



Hình 3. Sơ đồ tóm tắt quy trình tạo dòng vector pHT1224

Sản phẩm nối được biến nạp vào *E. coli* OmniMAXTM theo phương pháp hóa biến nạp. Các thể biến nạp được sàng lọc trên đĩa LB-Agar chứa ampicillin nồng độ 100 μ g/mL và phản ứng PCR khuẩn lạc với cặp mồi ON741/ON314 cho plasmid pHT1222 và cặp mồi ON653/ON744 cho plasmid pHT1224, trong đó có một mồi bắt cặp trên plasmid gốc và một mồi bắt cặp trên đoạn gen được chèn (Hình 2). Sau khi sàng lọc và

chọn được khuẩn lạc mang plasmid pHT1222 và pHT1224, tiến hành tách chiết plasmid thông qua bộ kit QIAprep Plasmid purification Mini kit (Qiagen) và giải trình tự vùng gen được chèn với mồi ON653 tại công ty MacroGen Inc nhằm kiểm tra trình tự và xác nhận một cách chính xác vector pHT1222 và pHT1224.

Biểu hiện protein dung hợp LysSN-6xHis-TEV-GFP trong B. subtilis

Vector tái tổ hợp pHT1224 được biến nạp vào *B. subtilis* 1012 theo phương pháp biến nạp tự nhiên. Các khuẩn lạc mọc trên môi trường LB-Agar có bổ sung kháng sinh chloramphenicol nồng độ 10 µg/mL được chọn để nuôi cấy lắc trong 100 mL môi trường lỏng ở 37 °C. Khi giá trị OD₆₀₀ của dịch nuôi cấy đạt 0,8, cảm ứng biểu hiện protein mục tiêu bằng IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) với nồng độ 0,5 mM, nhiệt độ nuôi cấy là 30 °C và thời gian cảm ứng là 2 giờ. Tiến hành nuôi cấy song song cùng một khuẩn lạc và không cảm ứng IPTG để làm đối chứng âm (-). Kiểm tra sự biểu hiện protein dung hợp LysSN-6xHis-TEV-GFP thông qua quan sát màu của dịch nuôi cấy và điện di protein trên gel **polyacrylamide** (SDS-PAGE). Đánh giá tính tan của protein mục tiêu bằng phương pháp SDS-PAGE kiểm tra lượng protein hiện diện trong dịch nổi sau khi phá vỡ tế bào bằng sóng siêu âm.

Tinh chế protein GFP

Tiến hành nuôi cấy chủng *B. subtilis* 1012 mang vector pHT1224 ở quy mô bồn lên men 5 lít, nhiệt độ 30 °C và nồng độ chất cảm ứng IPTG 0,5 mM, thời điểm cảm ứng khi giá trị OD₆₀₀ của dịch nuôi cấy đạt khoảng 2,5 (giữa pha log). Theo dõi đường cong tăng trưởng của chủng nuôi cấy và thu sinh khối khi đến đầu pha cân bằng.

Sinh khối được huyền phù trong 100 mL dung dịch đệm ly giải chứa 30 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 10 % glycerol, 25 mM imidazole, 1 mg/mL lysozyme, 1 mg/mL DnaseI và 1 mM PMSF. Tế bào được phá vỡ bằng sóng siêu âm, biên độ sóng (Amplitude) 70 trong 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ 30 giây và 30 giây nghỉ. Ly tâm 10.000 g trong 20 phút ở 4 °C, thu nhận phần dịch nổi và nạp qua cột Histrap HP 5 mL (GE healthcare) nhằm tinh chế protein mục tiêu chứa His-tag. Rửa cột bằng đệm ly giải với thể tích gấp 3 lần thể tích dịch protein qua cột và dung ly protein mục tiêu bám trên cột bằng dung

dịch chứa 30 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 10 % glycerol và 25-250 mM **Imidazole**.

Protein dung hợp LysSN-6xHis-TEVsite-GFP sau khi được tinh chế, tiến hành cắt bởi TEV protease (tỷ lệ 30:1) trong dung dịch đệm 30 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 10 % glycerol, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT. Phản ứng cắt được thực hiện ở 4 °C, qua đêm. Dịch protein sau khi cắt được loại bỏ đuôi dung hợp chứa His-tag thông qua cột Histrap HP 5 mL, thu nhận phân đoạn sau cột chứa protein GFP tinh sạch. Kiểm tra kết quả thu nhận protein bằng phương pháp SDS-PAGE.

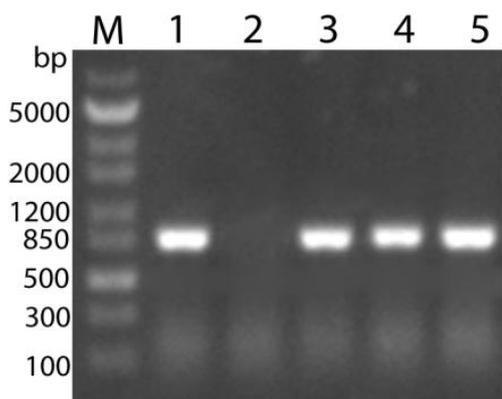
Xác định khối lượng phân tử bằng LC-MS

Protein GFP sau khi tinh sạch được pha loãng về nồng độ 1 mg/mL và gửi phân tích LC-MS tại Phòng thí nghiệm Phân tích Trung tâm, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM. Kết quả được xử lý bằng phần mềm Bruker Compass DataAnalysis 4.0.

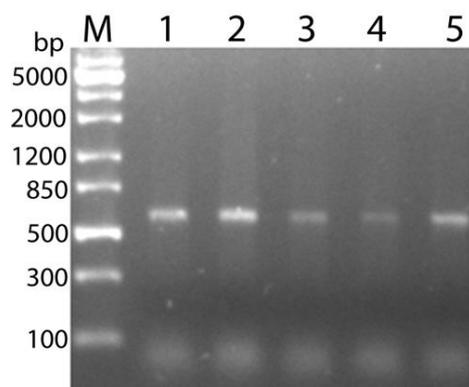
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tạo dòng vector pHT1224

Sản phẩm nối giữa gen *gfp* và plasmid pHT282 được biến nạp vào *E. coli* OmniMAX, 5 khuẩn lạc mọc trên môi trường LB-agar-ampicillin được chọn để tiến hành phản ứng PCR khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu ON741/ON314 nhằm sàng lọc các thể biến nạp mang đúng plasmid mục tiêu pHT1222. Đoạn DNA khuếch đại được dự đoán có kích thước 846 bp. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1 % cho thấy 4 khuẩn lạc được chọn cho vạch sáng có kích thước đúng với dự đoán (Hình 4, giếng 1, 3, 4, 5). Khuẩn lạc 1 tiếp tục được chọn để tách chiết plasmid và giải trình tự đoạn DNA được chèn, kết quả so sánh cho thấy có sự tương đồng 100 % so với trình tự lý thuyết của gen *gfp*. Như vậy, vector pHT1222 đã được tạo dòng và thu nhận thành công.



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc sàng lọc vector pHT1222 trên gel agarose; M: Thang DNA; 1-5: Khuẩn lạc 1-5

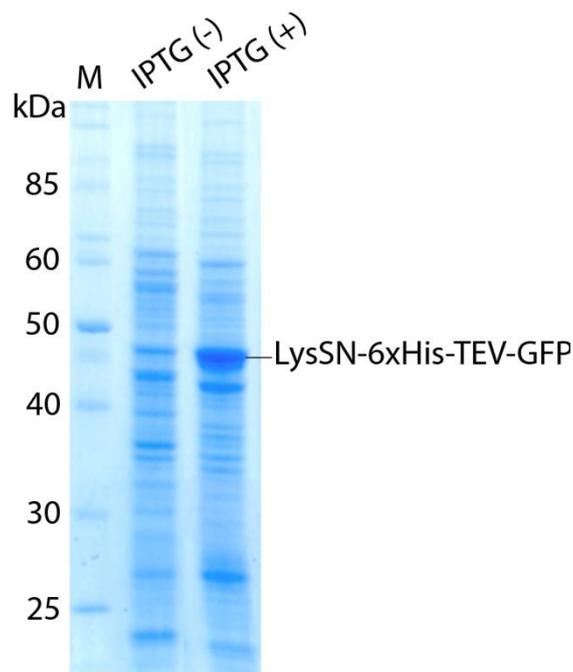


Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc sàng lọc vector pHT1224 trên gel agarose; M: Thang DNA; 1-5: Khuẩn lạc 1-5

Tương tự, 5 khuẩn lạc *E. coli* OmniMAX mang sản phẩm nối giữa gen mã hóa đuôi dung hợp LysSN-6xHis-TEV và plasmid pHT1222 mọc trên môi trường LB-agar-ampicillin được sử dụng cho phản ứng PCR khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu ON653/ON744 nhằm chọn ra các thể biến nạp mang đúng plasmid mục tiêu pHT1224. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy cả 5 khuẩn lạc khảo sát đều cho vạch sáng có kích thước đúng với kích thước dự đoán của đoạn DNA được khuếch đại là 758 bp (Hình 5). Khuẩn lạc 5 được chọn để tách plasmid và giải trình tự, cho thấy sự tương đồng 100 % giữa trình tự đoạn gen được chèn so với trình tự lý thuyết và có sự dung hợp giữa gen mã hóa đuôi LysSN-6xHis-TEV và gen *gfp*. Điều này chứng tỏ vector pHT1224 cũng đã được tạo dòng và thu nhận thành công.

Kết quả biểu hiện protein dung hợp LysSN-6xHis-TEV-GFP trong *B. Subtilis*

Plasmid pHT1224 sau khi đã kiểm tra trình tự được biến nạp vào chủng *B. subtilis* 1012. Khuẩn lạc mọc được trên đĩa môi trường có kháng sinh chloramphenicol được chọn để nuôi cấy và cảm ứng, sau đó kiểm tra sự biểu hiện protein dung hợp LysSN-6xHis-TEV-GFP. Sinh khối thu được có sự khác biệt về màu sắc giữa mẫu nuôi cấy có cảm ứng IPTG và mẫu nuôi cấy không cảm ứng, trong đó mẫu có cảm ứng có màu xanh lục so với mẫu không cảm ứng không xuất hiện màu xanh (dữ liệu không được trình bày). Sinh khối được tiếp tục phân tích protein bằng điện di SDS-PAGE. Kết quả cho thấy ở mẫu nuôi cấy có cảm ứng xuất hiện 1 vạch protein đậm có kích thước khoảng 46,5 kDa, tương ứng với kích thước của protein dung hợp (Hình 6). Điều này chứng tỏ khuẩn lạc *B. subtilis* được chọn có mang đúng vector pHT1224 và cho khả năng biểu hiện tốt protein mục tiêu. Khuẩn lạc này được sử dụng để nuôi cấy với quy mô lớn hơn nhằm tiến hành tinh chế ở các thí nghiệm tiếp theo.

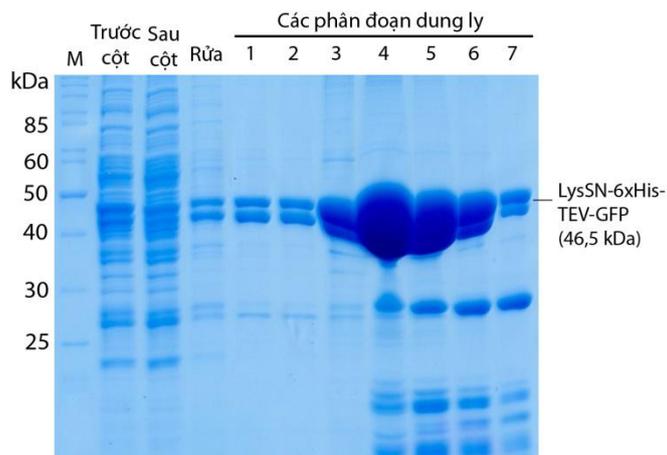


Hình 6. Kết quả kiểm tra sự biểu hiện protein dung hợp LysSN-6xHis-TEV-GFP trong chủng *B. subtilis* mục tiêu bằng phương pháp điện di protein (SDS-PAGE); M: Thang protein; IPTG(-): Mẫu nuôi cấy không cảm ứng IPTG, IPTG(+): Mẫu nuôi cấy có cảm ứng IPTG.

Kết quả tinh chế protein GFP

Chủng *B. subtilis* mang plasmid pHT1224 sau khi được kiểm tra khả năng biểu hiện được tiếp tục nuôi cấy cảm ứng biểu hiện trong bồn lên men 5 lít. Protein tái tổ hợp được tinh chế qua cột Histrap HP 5 ml. Các phân đoạn có sự hiện diện của GFP được dễ dàng xác định thông qua màu huỳnh quang xanh lục (dữ liệu không được trình bày). Kết quả điện di cho thấy, ở phân đoạn protein sau khi qua cột vẫn còn hầu hết các vạch protein cơ bản của *B. subtilis* trong

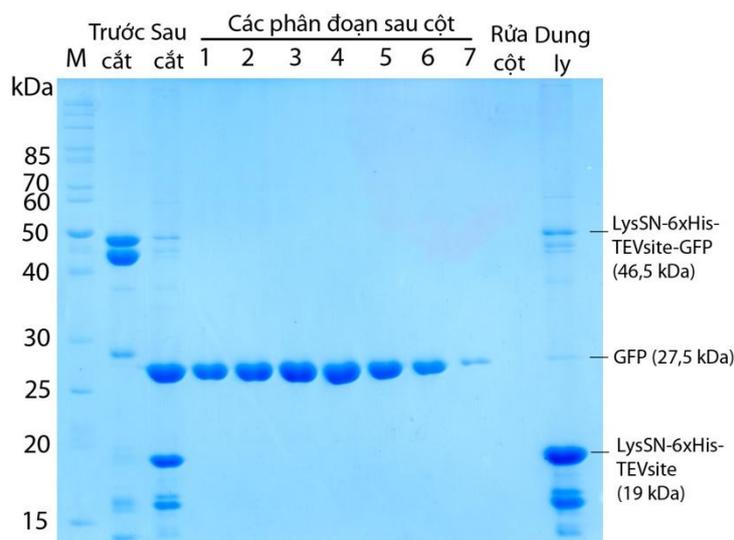
khi vạch protein ở vị trí có kích thước khoảng 46,5 kDa mờ hơn hẳn khi so sánh với phân đoạn protein trước khi qua cột (Hình 7). Điều này chứng tỏ protein dung hợp mục tiêu (LysSN-6xHis-TEVsite-GFP, 46,5 kDa) do có đuôi 6xHis nên đã được giữ lại trên cột và tách khỏi dịch protein tổng số. Các phân đoạn dung ly sau đó có màu xanh lục, đồng thời khi điện di có vạch protein 46,5 kDa khá đậm, cho thấy protein mục tiêu đã được thu nhận thành công.



Hình 7. Kết quả tinh chế protein dung hợp LysSN-6xHis-TEV-GFP.

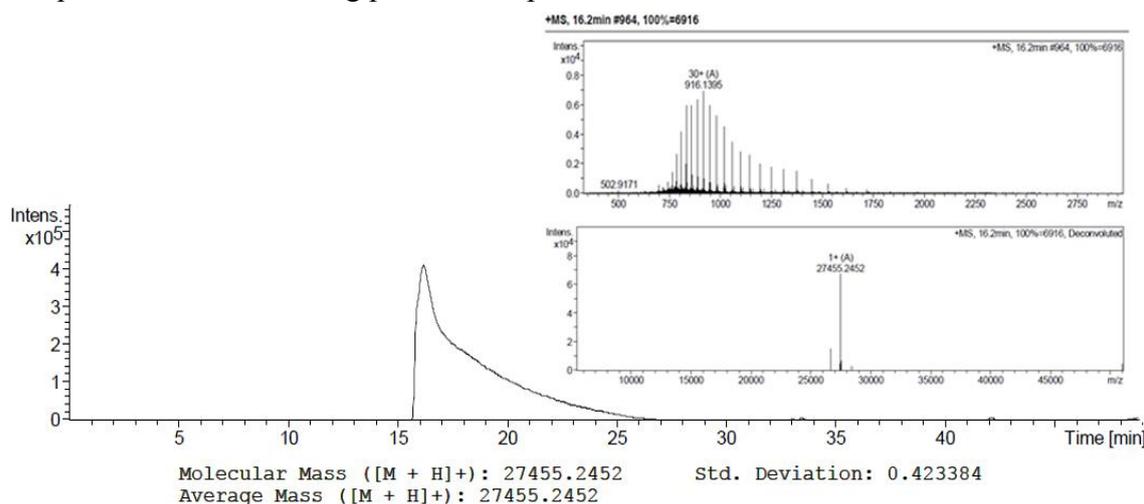
Tuy thu được lượng lớn protein tái tổ hợp nhưng chưa tinh sạch hoàn toàn và vẫn còn ở dạng dung hợp với LysSN-6xHis-TEV. Do đó, tiếp tục tinh sạch và loại bỏ đuôi dung hợp ra khỏi protein mục tiêu. Các phân đoạn dung ly được đồng nhất với nhau, sau đó pha loãng về nồng độ 1 mg/mL (phân đoạn trước cắt) và tiến hành phản ứng cắt protein dung hợp LysSN-6xHis-TEV-GFP bằng TEV protease. Kết quả điện di (SDS-PAGE) các phân đoạn protein cho thấy, ở phân đoạn protein trước khi cắt có vạch kích thước khoảng 46,5 kDa tương ứng protein dung hợp, trong khi ở phân đoạn sau khi cắt xuất hiện 2 vạch protein có kích thước 27,5 kDa và 19 kDa, tương ứng với kích thước của protein GFP và đuôi LysSN-6xHis. Điều này chứng tỏ protein

tái tổ hợp có chứa trình tự đặc hiệu TEV khi biểu hiện trong *B. subtilis* có khả năng được cắt hiệu quả bởi TEV protease. Khi cho dịch protein sau phản ứng cắt chảy qua cột Histrap HP 5 mL, các phân đoạn sau cột chỉ còn xuất hiện vạch 27,5 kDa, tương ứng với protein GFP, trong khi vạch 19 kDa tương ứng với đuôi LysSN-6xHis và vạch 46,5 kDa tương ứng với protein dung hợp chưa được cắt đã được giữ lại trên cột và xuất hiện lại trong phân đoạn dung ly (Hình 8), tách khỏi dịch chứa protein mục tiêu. Như vậy, protein GFP đã được thu nhận thành công. Các protein tạp trong phân đoạn trước cắt và sau cắt (kích thước khác 46,5 kDa, 27,5 kDa và 19 kDa, (Hình 8) không ảnh hưởng đến kết quả thu nhận GFP tái tổ hợp.



Hình 8. Kết quả cắt loại bỏ đuôi dung hợp và thu nhận GFP tinh sạch.

Kết quả xác định khối lượng phân tử của protein GFP



Hình 9. Kết quả phân tích LC-MS của phân đoạn protein GFP tái tổ hợp sau khi tinh sạch

Các phân đoạn sau cột chứa protein GFP mục tiêu được đồng nhất với nhau, sau đó pha loãng về nồng độ 1 mg/mL và phân tích LC-MS. Kết quả cho thấy chỉ có 1 cấu tử protein duy nhất có khối lượng phân tử khoảng 27455,2452 Da (tương ứng với khối lượng protein GFP trong tự nhiên) (Hình 9), không thấy các sản phẩm phụ đồng thời protein mục tiêu có màu xanh lục đặc trưng. Điều này khẳng định protein GFP đã được

cắt một cách chính xác ra khỏi dạng dung hợp và được thu nhận với độ tinh sạch cao.

KẾT LUẬN

Kết quả của nghiên cứu cho thấy protein mục tiêu có thể được biểu hiện ở dạng dung hợp với đuôi LysSN-6xHis-TEV một cách hiệu quả trong *B. subtilis* và được thu nhận dễ dàng với độ tinh sạch cao thông qua phương pháp sắc kí ái lực qua cột Ni²⁺. Điều này đã khẳng định tiềm năng to

lớn của *B. subtilis* trong lĩnh vực sản xuất protein tái tổ hợp. Tuy nhiên, để thực sự có thể ứng dụng *B. subtilis*, nhiều nghiên cứu chuyên sâu hơn cần được tiếp tục tiến hành như: khảo sát và so sánh khả năng biểu hiện trong *B. subtilis* của nhiều protein mục tiêu khác nhau với nhiều đuôi dung hợp khác nhau, khảo sát tính tan và hoạt tính của protein mục tiêu sau khi được biểu hiện ở dạng

dung hợp, đánh giá hiệu suất tinh chế cũng như hoạt tính của protein mục tiêu sau khi thu nhận.

LỜI CẢM ƠN: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.16-2011.80.

Intracellular expression and investigation of the possibility for purifying recombinant protein in *Bacillus subtilis* using reporter GFP

• Phan Thi Phuong Trang

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Escherichia coli and *Bacillus subtilis* are the most popular model organisms for Gram-negative and Gram-positive bacteria. Though this Gram-positive bacterium has a great advantage – endotoxin-free, the use of *B. subtilis* for expression and purification is not much interested as compared to *E. coli*. The reason for this is the lack of information and technology platforms on the production of recombinant proteins in *B. subtilis*. In the previous studies, pHT vector system has been demonstrated to allow the high levels of recombinant protein expression in *B. subtilis*. In this study, we used GFP as a marker for intracellular expression in *B. subtilis* and examining the purification capability of the recombinant protein. The expression vector was designed with *gfp* gene fused to the gene encoding the N-terminus of

Keywords: *Bacillus subtilis*, GFP, LysSN, expression system pHT, affinity chromatography.

LysS protein (*lysSN*), His-tag and specific cleavage site of TEV protease to enhance the expression of the target protein as well as contribute to the purification and removing fusion tag afterwards. The results showed that this vector allowed the effective expression of the fusion protein LysSN-6xHis-TEV-GFP in *B. subtilis*, the target protein could be purified through Ni^{2+} column with a high purity and fusion tag could be completely removed by TEV protease. Recombinant GFP obtained after purification was determined the molecular weight by LC-MS that exhibited the analogy with the natural GFP protein. This study showed a great potential of using pHT expression system with endotoxin-free *B. subtilis* as a host for intracellular expression and purification of recombinant proteins.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. K. Graumann, A. Premstaller, Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems, *Biotechnology Journal*, 1, 164–186 (2006).
- [2]. J.J. Greene, Host cell compatibility in protein expression, *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 267, 3–14 (2004).
- [3]. T. Miyamoto, S. Okano, N. Kasai, Inactivation of *Escherichia coli* endotoxin by soft hydrothermal processing, *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 5058–5063 (2009).
- [4]. H.D. Nguyen, Q.A. Nguyen, R.C. Ferreira, L.C.S. Ferreira, L.T. Tran, W. Schumann, Construction of plasmid-based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability, *Plasmid*, 54, 241–248 (2005).
- [5]. T.T.P. Phan, H.D. Nguyen, W. Schumann, Novel plasmid-based expression vectors for intra- and extracellular production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*, *Protein expression and purification*, 46, 189–195 (2006).
- [6]. H. Saito, T. Shibata, T. Ando, Mapping of genes determining nonpermissiveness and host-specific restriction to bacteriophages in *Bacillus subtilis* Marburg, *Molecular & General Genetics: MGG*, 170, 117–122 (1979).
- [7]. M. Zimmer, Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior, *Chemical Reviews*, 102, 759–781 (2002).