

# Tạo dòng và khảo sát biểu hiện phiên bản GFP (Green Fluorescent Protein) cho khả năng biểu hiện tốt trong *Bacillus subtilis*

- Nguyễn Hoài Nam
- Phan Thị Phượng Trang
- Trần Linh Thuộc
- Nguyễn Đức Hoàng

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

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

## TÓM TẮT

*Gen gfp* mã hóa cho protein GFP (Green Fluorescent Protein) có nguồn gốc từ sứa *Aequorea victoria* là protein chỉ thị được sử dụng rất phổ biến, do (i) sự biểu hiện được nhận biết dễ dàng thông qua khả năng phát huỳnh quang, (ii) không cần cơ chất hay cofactor, (iii) ít ảnh hưởng đến protein mục tiêu khi dung hợp. Nhiều biến thể của GFP đã được nghiên cứu và cải tiến, trong đó, superfolder GFP với các đặc tính có lợi như gấp cuộn nhanh, cấu trúc ổn định và phát huỳnh quang mạnh đã cho thấy khả năng ứng dụng rất lớn của protein này. Tuy nhiên, superfolder GFP chỉ mới được phát triển trên *Escherichia coli*, việc ứng dụng phiên bản này

cho các chủng chủ khác gặp nhiều khó khăn do tần suất sử dụng codon và khả năng gấp cuộn sau dịch mã của mỗi chủng chủ. Trong nghiên cứu này, với mục tiêu phát triển một phiên bản GFP phù hợp cho *Bacillus subtilis*, chúng tôi tiến hành tạo ra các đột biến điểm trên gen *gfp+* nhằm loại bỏ các vị trí enzyme cắt thông dụng BamHI, XhoI giúp thuận lợi cho việc dòng hóa; đồng thời thay đổi các codon Y39N, N105T, I171V sao cho tương thích với *B. subtilis*. Kết quả cho thấy phiên bản GFP sau đột biến cho khả năng phát huỳnh quang tốt hơn và các vị trí enzyme cắt giới hạn nêu trên cũng đã được loại bỏ.

**Từ khóa:** *Bacillus subtilis*, pHT, GFP, superfolder GFP.

## MỞ ĐẦU

Cùng với sự phát triển của công nghệ sinh học, việc tìm ra các gen chỉ thị hiệu quả là một trong những chiến lược hàng đầu. Gen chỉ thị mã hóa cho một protein mà sự biểu hiện của nó dễ dàng kiểm tra thông qua các kiểu hình đặc trưng. Một trong những gen chỉ thị được sử dụng khá phổ biến hiện nay là *gfp* có nguồn gốc từ sứa *Aequorea victoria* mã hóa cho protein GFP (Green Fluorescent Protein) [5] do có nhiều ưu điểm như

(i) khả năng phát huỳnh quang không cần cofactor hay cơ chất, (ii) ít ảnh hưởng đến hoạt tính của protein mục tiêu, (iii) không gây độc trong hầu hết trường hợp, (iv) có thể được nhận biết mà không cần phá vỡ tế bào. Ngoài ra, GFP còn có đặc tính bền với nhiệt, bền với chất tẩy rửa, pH kiềm và nồng độ muối cao nên được ứng dụng rất rộng rãi mà không cần quan tâm nhiều đến điều kiện hoạt động [12]. Tuy nhiên, GFP trong tự nhiên vẫn còn

nhieu nhược điểm như gấp cuộn chậm và mức độ phát huỳnh quang chưa đủ mạnh nên đôi khi khó phát hiện [1]. Do đó, nhiều biến thể của GFP đã được nghiên cứu và cải tiến cho thấy khả năng ứng dụng rất lớn của protein này trong các lĩnh vực nghiên cứu sự di chuyển, chức năng và tương tác của protein mục tiêu trong tế bào, dung hợp với các cấu trúc khác trong nghiên cứu gen và hệ thống biểu hiện [9, 10]. Trong đó, superfolder GFP với các đặc tính có lợi như gấp cuộn nhanh, cấu trúc ổn định và phát huỳnh quang mạnh đang là một đối tượng khá hấp dẫn [6]. Hạn chế lớn nhất của superfolder GFP là chỉ mới được phát triển trên *Escherichia coli*, việc ứng dụng phiên bản này cho các chủng chủ khác gặp nhiều khó khăn. Mức độ phát huỳnh quang không chỉ chịu ảnh hưởng bởi lượng protein, khả năng gấp cuộn mà còn phụ thuộc vào tốc độ sao chép, sự ổn định của mRNA, tín hiệu dịch mã và khả năng sử dụng codon trong tế bào chủ [3]. Như vậy, để có được hiệu quả sử dụng protein chỉ thị tối ưu, việc lựa chọn một biến thể GFP phù hợp cho mỗi loài chủng chủ thực sự quan trọng và cần thiết [2].

*Bacillus* là chủng vi khuẩn được sử dụng phổ biến trong công nghệ vi sinh vật từ rất lâu. Hơn 60 % sản lượng enzyme công nghiệp được sản xuất từ chủng này. Với đặc tính an toàn trong thực phẩm, khả năng tiết protein vào môi trường, tăng trưởng với tốc độ cao, việc nghiên cứu và ứng dụng các chủng *Bacillus* ngày càng được đẩy mạnh, tiêu biểu trong số đó là *B. subtilis* [4]. Tuy nhiên, GFP và các biến thể của nó thường được sử dụng làm chỉ thị trong sinh học lại biểu hiện kém trong chủng vi sinh vật này. Một số nghiên cứu cho thấy, gen *gfp+* mã hóa cho một phiên bản GFP có khả năng biểu hiện cao trong *B. subtilis* nhờ các codon tối ưu hơn [11].

Trong nghiên cứu này, với mục tiêu phát triển một phiên bản GFP mang những đột biến phù hợp

cho *B. subtilis*, chúng tôi tiến hành tạo ra các đột biến điểm trên gen *gfp+* nhằm loại bỏ các vị trí enzyme cắt thông dụng *BamHI*, *XhoI* giúp thuận lợi cho việc dòng hóa; đồng thời thay đổi các codon Y39N, N105T, I171V sao cho tương thích với *B. subtilis*. GFP sau đột biến sẽ là một phiên bản trung gian trong định hướng phát triển một phiên bản superfolder GFP cho *B. subtilis*. Hiệu quả biểu hiện của GFP sau đột biến sẽ được đánh giá dựa vào kết quả phân tích SDS-PAGE và khả năng phát huỳnh quang trong môi trường rắn và lỏng trên *B. subtilis*.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Chủng vi sinh vật, plasmid và môi trường nuôi cấy

*E. coli* OmniMAX (Invitrogen) được sử dụng ở bước dòng hóa, *B. subtilis* 1012 được dùng để đánh giá khả năng biểu hiện và phát huỳnh quang của GFP sau đột biến. Plasmid pHT10-*gfp+* được sử dụng làm plasmid gốc để tạo các đột biến trên gen *gfp+*. Thí nghiệm được thực hiện với đối chứng là pHT01 [7] như chứng âm không mang gen. Tế bào *B. subtilis* được nuôi cấy lắc trên môi trường Luria broth (LB) ở 37 °C, với kháng sinh chloramphenicol 10 µg/mL.

### Thiết kế plasmid

Để thuận lợi cho quá trình tạo phiên bản *gfp+* mang những đột biến mong muốn, chúng tôi tiến hành theo 2 bước. Bước thứ nhất, tạo plasmid pHT10-*gfp+*Δ*BamHI* bằng cách loại bỏ vị trí *BamHI* trên plasmid pHT10-*gfp+*, sử dụng phương pháp đột biến điểm định hướng (Quik Change Site-directed Mutagenesis, Qiagen, Agilent) với cặp môi ON411 (CCACAACAT TGAAGATGGTTCGGTTCAACTAGCAGAC) và ON412 (GTCTGCTAGTTGAACGGAACC ATCTTCAATGTTGTGG). Bước thứ hai, tạo plasmid pHT1241 mang những đột biến loại bỏ vị

trí cắt giới hạn *Xho*I và thay đổi các codon Y39N, N105T, I171V từ plasmid pHT10-*gfp*<sup>+</sup> $\Delta$ *Bam*HI bằng phương pháp đột biến đa điểm định hướng (Quik Change Site-directed Mutagenesis, Qiagen, Agilent) với các môi ON867B (GTGAAGGTGATGCTACAAACGG AAAGCTACCCTTAAA), ON867E (AAGAT GACGGGACATACAAGACGCGTGCTGAAG TCAAG), ON867F (TGGAACATTC TCGGACACAAACTCGAATACAACTTTAAC TCACACAA), ON867G (CTAACTTCAA AATTTCGCCACAACGTTGAAGATGGTTCC). Quá trình sàng lọc được thực hiện trong *E. coli* OmniMAX với môi ON314 (TGTTTCA ACCATTTGTTCCAGGT), plasmid đúng được biến nạp vào *B. subtilis* 1012.

#### Khảo sát khả năng phát huỳnh quang của GFP trên môi trường rắn

Các khuẩn lạc đơn *B. subtilis* chứa plasmid pHT10-*gfp*<sup>+</sup>, pHT10-*gfp*<sup>+</sup> $\Delta$ *Bam*HI, pHT1241 được khảo sát khả năng biểu hiện GFP nhằm đánh giá hiệu quả các đột biến. Thí nghiệm được tiến hành trên đĩa LB-Agar-Cm với 6 nồng độ IPTG (0 mM; 0,01 mM; 0,05 mM; 0,1 mM; 0,5 mM và 1 mM). Ủ ở 37 °C, 32 °C và 27 °C với thời gian tương ứng là 16 giờ, 24 giờ và 36 giờ. Sự phát huỳnh quang của khuẩn lạc được kích thích dưới bước sóng UV phản ánh mức độ biểu hiện của GFP, qua đó đánh giá được hiệu quả của phiên bản GFP sau đột biến. Hình ảnh được ghi nhận bằng máy chụp hình kỹ thuật số và được phân tích bằng phần mềm AlphaEaseFC (Alpha Inotech) để tính toán gray value (hay pixel value). Thực hiện tương tự với chứng âm là pHT01. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần trên 3 khuẩn lạc khác nhau.

#### Cảm ứng biểu hiện GFP

Tiến hành nuôi cấy *B. subtilis* 1012 chứa các plasmid pHT10-*gfp*<sup>+</sup>, pHT10-*gfp*<sup>+</sup> $\Delta$ *Bam*HI,

pHT1241 trong môi trường LB với kháng sinh chloramphenicol (10 µg/ml) ở 3 nhiệt độ 27 °C, 32 °C, 37 °C và tốc độ lắc 250 vòng/phút. Cảm ứng bằng IPTG tại thời điểm OD<sub>600</sub> đạt 0,8 – 1 với các nồng độ 0 mM; 0,01 mM; 0,05 mM; 0,1 mM; 0,5 mM và 1 mM. Thu mẫu 0, 2, 4 giờ sau cảm ứng sao cho OD<sub>600</sub> đạt 1,2. Sau đó ly tâm 9000 vòng/phút trong 3 phút để thu sinh khối và giữ mẫu ở -20 °C. Tiến hành tương tự và thu mẫu ở thời điểm 4 giờ sau cảm ứng với pHT01. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần trên 3 khuẩn lạc khác nhau. Mẫu sau khi thu sẽ được dùng để điện di SDS-PAGE và khảo sát hoạt tính GFP trên đĩa 384 giếng.

#### Kiểm tra sự biểu hiện bằng SDS PAGE

Hòa tan sinh khối trong 100 µl lysis buffer, 5 µl lysozyme 50 mg/mL, ủ ở 37 °C trong 5 phút, sau đó thêm 30 µL loading buffer 5X (0,135 M Tris/HCl; 30 % glycerol; 3 % SDS; 0,03 % bromophenol blue; 0,15 M DTT). Mẫu sau khi xử lý sẽ được ủ ở 95 °C trong 5 phút, ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút và thu dịch nổi tiến hành điện di SDS-PAGE. Đánh giá hiệu quả các đột biến thông qua mức độ biểu hiện của GFP sau đột biến.

#### Khảo sát hoạt tính GFP trên đĩa 384 giếng

Khả năng phát quang của GFP liên quan tới một cấu trúc Chromophore, được tạo thành bởi 3 acid amine Serine65-Tyrosine66-Glycine67 tại trung tâm hoạt động của chuỗi polypeptide. Quá trình đóng vòng là một chuỗi các phản ứng khử hydro và oxy hoá, tạo ra phân tử Chromophore trưởng thành cho phép hấp thu ánh sáng tối đa ở bước sóng 475 nm và phát huỳnh quang màu xanh lục có bước sóng 508 nm [5]. Mẫu tế bào *B. subtilis* 1012 mang các plasmid cần khảo sát được thu ở bước cảm ứng biểu hiện sẽ được phá

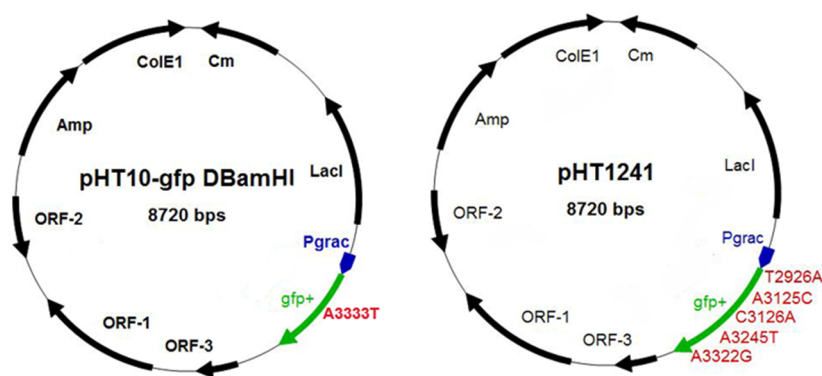
bằng dung dịch PBS 1X (Phosphate Buffer Saline) và nồng độ cuối của lysozyme là 1 mg/mL, ủ lactic trong 30 phút. Dịch sau ly tâm được đo trên đĩa 384 giếng với máy đọc đĩa (BioTek-Thermo, Mỹ). Kết quả được xử lý và tính toán bằng phần mềm Excel (Microsoft). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần trên 3 khuẩn lạc khác nhau.

## KẾT QUẢ

### Tạo plasmid

Sử dụng cặp môi ON411 và ON412 thực hiện đột biến điểm định hướng trên plasmid pHT10-

*gfp+* tạo plasmid pHT10-*gfp*<sup>+</sup> $\Delta$ *Bam*HI (Hình 1, Trái) mang đột biến loại bỏ vị trí *Bam*HI trên gen *gfp*<sup>+</sup>. Plasmid pHT10-*gfp*<sup>+</sup> $\Delta$ *bam*HI đúng sau khi giải trình tự sẽ là khung sườn để tạo plasmid pHT1241 (Hình 1, Phải) mang các đột biến  $\Delta$ *Xho*I, Y39N, N105T, I171V bằng đột biến đa điểm định hướng với các môi ON867B, ON867E, ON867F, ON867G. Kết quả giải trình tự hoàn toàn tương đồng với trình tự lý thuyết, plasmid pHT10-*gfp*<sup>+</sup> $\Delta$ *Bam*HI và pHT1241 tạo dòng thành công có cấu trúc như Hình 1

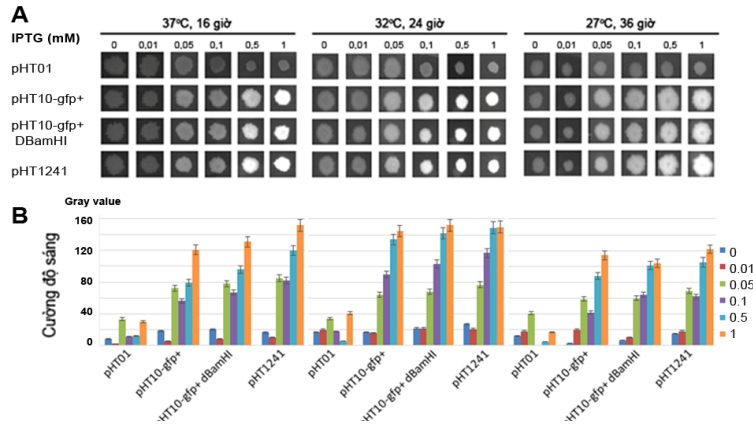


**Hình 1.** Sơ đồ của plasmid pHT10-*gfp*<sup>+</sup> $\Delta$ *Bam*HI (Trái) và pHT1241 (Phải), với gen *gfp*<sup>+</sup> được gây đột biến ở các vị trí trên trình tự nucleotide, tạo đột biến  $\Delta$ *Bam*HI trên pHT-*gfp*<sup>+</sup> $\Delta$ *Bam*HI và  $\Delta$ *Xho*I, Y39N, N105T, I171V trên pHT1241.

### Khảo sát hoạt tính GFP trên môi trường rắn

Các khuẩn lạc *B. subtilis* 1012 mang plasmid pHT10-*gfp*<sup>+</sup> $\Delta$ *Bam*HI, pHT1241 trên đĩa biến nạp được chấm lên các đĩa môi trường chứa LB-Agar-Cm bổ sung IPTG với 6 nồng độ tương ứng (Hình 2A). Tiến hành đồng thời cùng với mẫu chứng âm

pHT01 (-) và mẫu pHT10-*gfp*<sup>+</sup>. Thực hiện 3 lô thí nghiệm tương ứng với 3 nhiệt độ ủ khác nhau lần lượt ở 27 °C, 32 °C và 37 °C để đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ lên mức độ biểu hiện GFP.



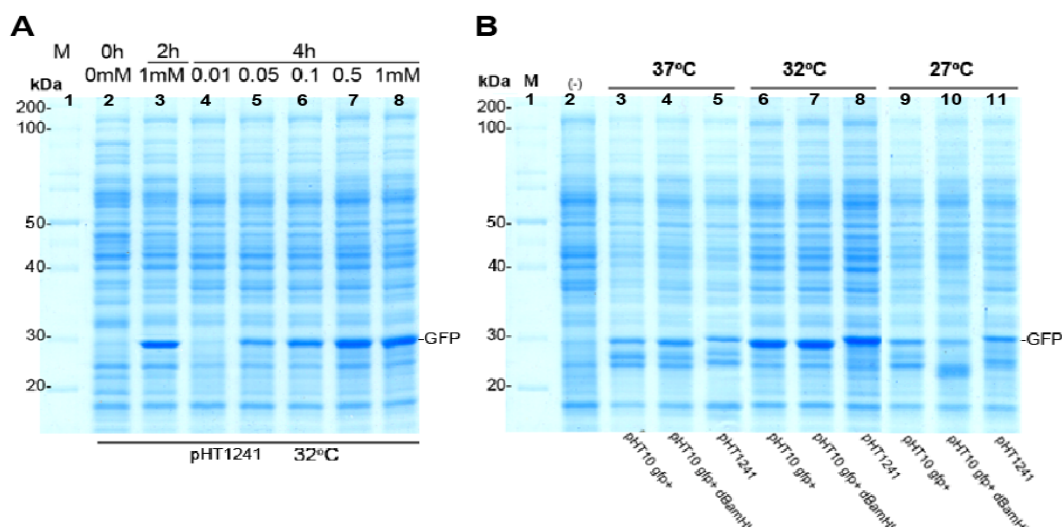
**Hình 2.** Kết quả trên đĩa môi trường chứa LB-Agar-Cm (A) và cường độ sáng bằng chương trình AlphaEase (B) với 6 nồng độ IPTG 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 và 1 mM ở các nhiệt độ 27 °C, 32 °C và 37 °C.

Kết quả sơ bộ trên đĩa thạch có độ chênh lệch nhỏ, không thể hiện được sự khác biệt. Tuy nhiên, qua đó chúng tôi có thể nhận thấy một số kết quả ban đầu như sau. Các chủng mang plasmid cần khảo sát cho khả năng phát huỳnh quang tăng dần theo nồng độ IPTG từ 0,05 mM và đạt cực đại ở 1 mM, trong khi chủng âm pHT01 không có hiện tượng này. Nhiệt độ cũng có ảnh hưởng đến sự biểu hiện GFP, bằng chứng là ở 32 °C, sự phát huỳnh quang của các khuẩn lạc là mạnh nhất. Kết quả được kiểm tra lại bằng phần mềm đo cường độ sáng AlphaEase (Alpha Inotech), chủng *B. subtilis* 1012/pHT1241 cho giá trị cường độ sáng cao nhất, hai plasmid còn lại có mức độ tương

đương; tuy nhiên, ở 27 °C, pHT10-gfp+ΔBamHI cho kết quả biểu hiện thấp nhất. Kết quả này sẽ được kiểm chứng bằng thí nghiệm khảo sát trong môi trường lỏng.

#### Cảm ứng biểu hiện GFP

Quy trình khảo sát biểu hiện trên môi trường lỏng được mô tả trong phần Vật liệu phương pháp. Nồng độ IPTG sử dụng khảo sát lần lượt là 0 mM; 0,01 mM; 0,05 mM; 0,1 mM; 0,5 mM và 1 mM với thời gian thu mẫu là 0 giờ, 2 giờ và 4 giờ. Mẫu được kiểm tra mức độ biểu hiện GFP bằng điện di SDS-PAGE trên gel 12 % và nhuộm bằng Coomassie Blue cho vạch màu xanh.



**Hình 3.** Kết quả điện di SDS-PAGE; Mẫu *B. subtilis* 1012/pHT1241 ở 32 °C với 6 nồng độ IPTG và thời điểm thu mẫu 0, 2, 4 giờ (A); Mẫu *B. subtilis* 1012 với các plasmid cần khảo sát được lắc biểu hiện trong 4 giờ với nồng độ IPTG 1 mM (B) ở 37 °C, 32 °C và 27 °C (B).

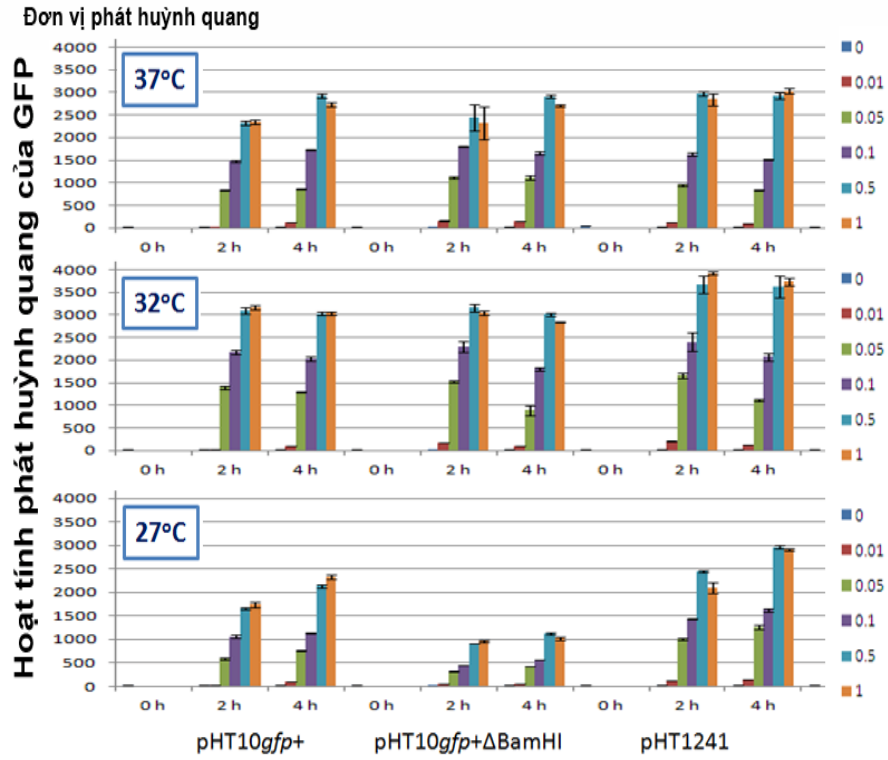
Trước tiên, chúng tôi chọn thời gian và nồng độ chất cảm ứng biểu hiện tối ưu bằng cách khảo sát plasmid pHT1241 ở 32 °C (nhiệt độ cho kết quả phát huỳnh quang tốt nhất khi khảo sát trên đĩa thạch) và thu được kết quả như Hình 3A. So sánh độ đậm của các vạch protein mục tiêu tại các thời điểm thu mẫu và nồng độ IPTG tương ứng, chúng tôi nhận thấy mức độ biểu hiện tốt nhất được ghi nhận tại thời điểm 4 giờ sau cảm ứng với 1 mM IPTG (Hình 3A, Giếng 8). Như vậy, điều kiện này sẽ được chọn để so sánh lượng GFP được tạo ra giữa các plasmid ở 3 nhiệt độ 27 °C, 32 °C và 37 °C kết quả được thể hiện ở Hình 3B.

GFP có kích thước tương đương là 27 kDa, nhưng do có sự thay đổi về codon trong cấu trúc mà pHT1241 cho vạch protein cao hơn so với hai plasmid còn lại. So với 37 °C và 27 °C, các vạch GFP được biểu hiện ở 32 °C cho kết quả cao nổi bật (Hình 3B, Giếng 6, 7, 8). Cả 3 plasmid cần khảo sát đều cho vạch GFP khá rõ ở cùng nhiệt độ và các vạch này lại không có sự khác biệt nhiều

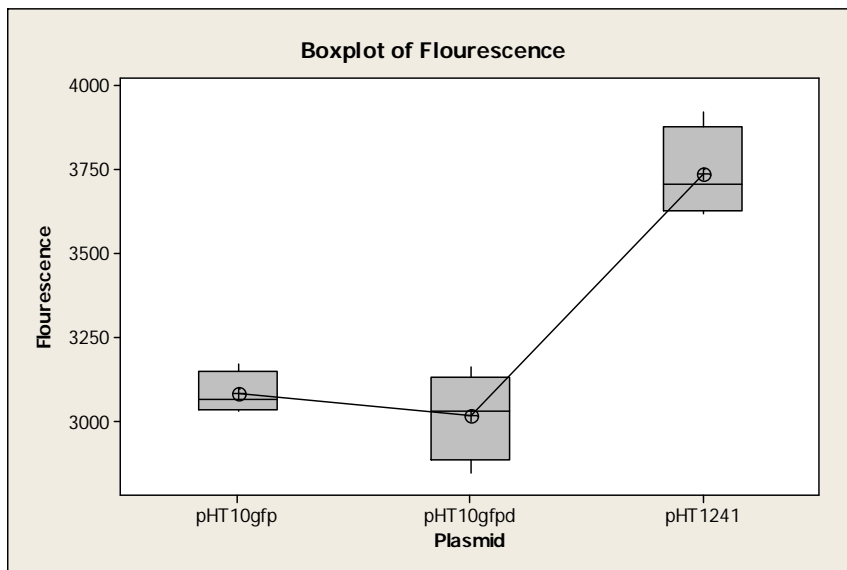
(Hình 3B), như vậy lượng protein được tạo ra gần như tương đương giữa các plasmid. Tuy nhiên, ở 27 °C, sự biểu hiện của pHT-*gfp*<sup>+</sup> $\Delta$ *BamHI* giảm rõ rệt so với 2 plasmid còn lại, kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả khảo sát hoạt tính trên đĩa. Có khả năng việc loại bỏ vị trí *BamHI* trong gen *gfp*<sup>+</sup> đã ảnh hưởng đến sự biểu hiện của gen này trong *B. subtilis*. Để có những đánh giá chuẩn xác hơn, chúng tôi tiếp tục thực hiện khảo sát mức độ biểu hiện của GFP trên đĩa 384 giếng.

#### Khảo sát hoạt tính phát huỳnh quang của GFP trên đĩa 96 giếng

Phương pháp đo huỳnh quang có ưu điểm là cho ra kết quả có độ nhạy cao, thể hiện được khả năng phát huỳnh quang của GFP một cách chính xác. Đo huỳnh quang trên đĩa 384 giếng có nhằm khảo sát được những yếu tố không thể thực hiện bằng phương pháp khảo sát hoạt tính trên đĩa và SDS-PAGE. Các plasmid được biểu hiện trong thời gian 2 giờ và 4 giờ, với nồng độ 6 nồng độ IPTG. Số liệu được thể hiện dưới dạng biểu đồ cột như Hình 4.



**Hình 4.** Kết quả khảo sát khả năng phát huỳnh quang của pHT10-gfp+, pHT10- gfp+ΔBamHI, pHT1241 trên đĩa 384 giếng ở 37 °C (Trên), 32 °C (Giữa) và 27 °C (Dưới).



**Hình 5.** Kết quả phân tích ANOVA One-way đánh giá ảnh hưởng của đột biến lên hoạt tính GFP

|      |                                  |      |                                  |
|------|----------------------------------|------|----------------------------------|
| 3289 | ggaatcaaag ctaacttcaa aattcgccac | 3289 | ggaatcaaag ctaacttcaa aattcgccac |
|      | >.....gfp+.....>                 |      | >.....GFP.....>                  |
|      | g i k a n f k i r h              |      | g i k a n f k i r h              |
|      | <u>BamHI</u>                     |      |                                  |
| 3319 | aacattgaag atggatccgt tcaactagca | 3319 | aacattgaag atggttccgt tcaactagca |
|      | >.....gfp+.....>                 |      | >.....GFP.....>                  |
|      | n i e d g s v q l a              |      | n i e d g s v q l a              |
| 3349 | gaccattatc aacaaaatac tccaattggc | 3349 | gaccattatc aacaaaatac tccaattggc |
|      | >.....gfp+.....>                 |      | >.....GFP.....>                  |
|      | d h y q q n t p i g              |      | d h y q q n t p i g              |

Collect

**Hình 5.** Đột biến điểm nhằm loại bỏ vị trí *BamHI* từ plasmid pHT10-*gfp*<sup>+</sup>(Trái) tạo pHT10-*gfp*<sup>+</sup> $\Delta$ *BamHI*(Phải) Collector – filtering

Kết quả ở Hình 4, cho thấy khi lactic biểu hiện ở 37 °C, hoạt tính của GFP tạo ra từ chủng mang pHT1241 tốt hơn pHT10-*gfp*+ $\Delta$ *BamHI* tuy nhiên không thực sự chênh lệch nhiều (Hình 4, Trên). Trong khi đó, với mẫu được biểu hiện ở 32 °C (Hình 4, Giữa), biểu hiện của pHT1241 vượt trội hơn hẳn (~4000 đơn vị), cao gấp 1,3 lần so với 2 plasmid còn lại. Kết quả được kiểm tra bằng phân tích thống kê thể hiện ở Hình 5, sử dụng phương pháp ANOVA One-way (Minitab), giá trị *p*-value = 0,000 trong khoảng tin cậy 95 % ( $\alpha$  = 0,05). Cho thấy mức độ chênh lệch về khả năng phát huỳnh quang của pHT1241 so với 2 plasmid còn lại có ý nghĩa về mặt thống kê. Ở 27 °C (Hình 4, Dưới), chúng tôi nhận thấy ảnh hưởng rất lớn của việc loại bỏ *BamHI* lên sự biểu hiện của *gfp*<sup>+</sup> trong pHT10-*gfp*+ $\Delta$ *BamHI*, khả năng phát huỳnh quang thấp (~1000 đơn vị), chỉ bằng 1/3 so với các trường hợp khác, vấn đề này sẽ được thảo luận ở phần sau. So sánh giữa 3 nhiệt độ, chúng tôi thu được kết quả tương tự như khi khảo sát bằng phương pháp trên thạch và điện di SDS-PAGE khi so sánh. Khả năng phát huỳnh quang của GFP ở

32 °C cao nhất, 37 °C yếu hơn và cuối cùng là 27 °C.

### THẢO LUẬN

Việc loại bỏ vị trí *BamHI* trong trường hợp pHT10-*gfp*+ $\Delta$ *BamHI* tuy vẫn giữ nguyên trình tự amino acid nhưng trình tự của gen sau đột biến đã thay đổi. So sánh trình tự trước và sau đột biến (Hình 5), codon GGA (trình tự trên gen là GGA) nằm trong vị trí nhận biết *BamHI* (Hình 5, Trái) được thay thế bởi một codon khác GGU (trình tự trên gen là GGT) cùng mã hóa cho glycine (Hình 5, Phải). Tuy nhiên, xét về tần suất sử dụng codon trên *B. subtilis* thì codon trước đột biến - GGA (21,8 %) cho hiệu quả sử dụng cao hơn so với codon sau đột biến - GGU (13,0 %) [8]. Như vậy việc loại bỏ trình tự *BamHI* đã làm thay đổi tần suất sử dụng codon của gen mục tiêu trong *B. subtilis*, dẫn đến việc giảm biểu hiện của pHT10-*gfp*+ $\Delta$ *BamHI* và sự ảnh hưởng này càng rõ hơn khi nuôi cấy ở nhiệt độ thấp, trong trường hợp này là 27 °C.



Theo kết quả ghi nhận được, mức độ phát huỳnh quang của GFP phụ thuộc vào 2 yếu tố, lượng protein được tạo ra và khả năng gấp cuộn. Khi so sánh giữa các nhiệt độ, lượng protein ở 32 °C được tạo ra nhiều nhất và khả năng phát huỳnh quang cũng cao nhất. Còn ở cùng một nhiệt độ, lượng protein được tạo ra tương đương nhau (kết quả từ phương pháp điện di SDS-PAGE) nhưng khả năng phát huỳnh quang của protein tạo ra từ pHT1241 lại vượt trội hơn hẳn so với 2 plasmid ban đầu. pHT1241 mang các đột biến làm thay đổi các acid amine, do đó làm thay đổi cấu trúc cũng như khả năng gấp cuộn của GFP, giúp GFP sau đột biến có khả năng phát huỳnh quang mạnh và bền hơn so với protein ban đầu.

#### KẾT LUẬN

Việc tạo các biến đổi trên trình tự amino

acid (Y39N, N105T, I171V) theo nội dung đề tài nhằm mục đích tăng khả năng gấp cuộn, khả năng phát sáng, độ bền của protein, đồng thời loại bỏ các trình tự enzyme cắt giới hạn phổ biến trên gen (*Bam*HI, *Xho*I) để thuận lợi hơn cho bước dòng hóa. Phạm vi nội dung của đề tài là một phần trong định hướng tạo một superfolder GFP mang các ưu điểm như gấp cuộn nhanh, phát huỳnh quang mạnh và phù hợp về tần suất sử dụng codon, cho hoạt động tốt trong *B. subtilis*. Công việc đã cho kết quả tương đối khả quan, tạo ra được một vector mang gen chỉ thị biểu hiện thành GFP có hoạt tính cao. Đây là bước trung gian quan trọng để tiếp tục thực hiện thêm nhiều đột biến trên gen *gfp+*, phát triển khả năng ứng dụng của GFP trong *B. subtilis*, giúp đưa các ứng dụng của GFP vào chủng chủ này ngày một dễ dàng, nhanh chóng và tiết kiệm hơn.

## Cloning and investigating GFP (green fluorescent protein) allowing higher expression in *Bacillus subtilis*

- Nguyen Hoai Nam
- Phan Thi Phuong Trang
- Tran Linh Thuoc
- Nguyen Duc Hoang

University of Science, VNU-HCM

#### ABSTRACT

*Gfp* gene coding for protein GFP (green fluorescent protein) from the jellyfish *Aequorea victoria* is the most popular indicator protein, due to (i) easy to recognize the expression through the fluorescent ability, (ii) without substrate or cofactor, (iii) less impact on the fusion protein target form. A lot of modifications of GFP have been studied and improved, in which GFP superfolder containing beneficial properties such as rapid

folding, structural stability and strong fluorescence showed great applicability. However, GFP superfolder has just been developed in *Escherichia coli*. It is difficult to apply this version for all other strains since codon usage and the folding ability of each host species. In this study, with the aim of generating a GFP gene which is suitable for *Bacillus subtilis*, we mutated in the gene *gfp+* to delete general *Bam*HI, *Xho*I restriction

enzyme site for facilitating in cloning step; as well as modified Y39N, N105T, I171V codon that is compatible with *B. subtilis*. The results showed that the mutations have made the

new version of GFP stronger in fluorescence and sequences of restriction enzymes have also been removed.

**Key words:** *Bacillus subtilis*, pHT plasmid, GFP, superfolder GFP.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. B.P. Cormack, R.H. Valdivia, S.Falkow, FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173, 1, 33-38 (1996).
- [2]. C. Gustafsson, S. Govindarajan, J. Minshull, Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*, 22, 7, 346-353 (2004).
- [3]. G. Lithwick, H. Margalit, Hierarchy of sequence-dependent features associated with prokaryotic translation. *Genome Research*, 13, 12, 2665-2673 (2003).
- [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, 3, 241-248 (2005).
- [5]. M. Ormö, A.B. Cubitt, K. Kallio, L.A. Gross, R.Y. Tsien, S.J. Remington, Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, 273, 5280, 1392-1395 (1996).
- [6]. J.D. Pédelacq, S. Cabantous, T. Tran, T.C Terwilliger, G.S. Waldo, Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*. 24(1) 79-88 (2006).
- [7]. 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, 2, 189-195 (2006).
- [8]. P.M. Sharp, E. Cowe, D.G. Higgins, D.C. Shields, K.H. Wolfe, F. Wright, Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a review of the considerable within-species diversity. *Nucleic Acids Research*, 16, 17, 8207-8211 (1988).
- [9]. C.N. Stewart, The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 20, 5, 376-382 (2001).
- [10]. J. Wahlfors, S. Loimas, T. Pasanen, T. Hakkarainen, Green fluorescent protein (GFP) fusion constructs in gene therapy research. *Histochemistry and Cell Biology*, 115, 1, 59-65 (2001).
- [11]. G.S. Waldo, B.M. Standish, J. Berendzen, T.C. Terwilliger, Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nature America Inc* 17, 7, 691-695 (1999).
- [12]. M. Zimmer, Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chemical Reviews*, 102, 3, 759-781 (2002).