

Tạo dòng biểu hiện tiết và khảo sát khả năng sử dụng đuôi CBM3a để tinh chế Endoglucanase A trong *Bacillus subtilis*

- Nguyễn Hoàng Ngọc Phương
- Nguyễn Thành Phước
- Phạm Lương Thắng
- Nguyễn Đức Hoàng
- Trần Linh Thuớc
- Phan Thị Phượng Trang

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 27 tháng 07 năm 2015, nhận đăng ngày 06 tháng 05 năm 2016)

TÓM TẮT

Các phương pháp tinh chế protein tái tổ hợp truyền thống có giá thành cao và không phù hợp khi áp dụng tinh chế protein dạng tiết với lượng thể tích lớn. Cellulose Binding Module 3a (CBM3a) thuộc phức hệ cellulosome từ chủng *Clostridium thermocellum* là một module có ái lực cao với cơ chất cellulose. Như vậy, nếu dung hợp protein mục tiêu với CBM3a và nhờ vào ái lực của CBM3a với cơ chất cellulose sẽ giúp tinh chế được protein mục tiêu với giá thành thấp. Các khảo sát ứng dụng CBM3a trong tinh chế protein tái tổ hợp trước đây đa phần đều thực hiện trong hệ thống biểu hiện nội bào. Việc thu nhận protein từ dịch tiết hoặc sử dụng chế phẩm

thô từ dịch tiết sẽ giúp quá trình sản xuất protein tái tổ hợp trên quy mô lớn được thuận lợi và đạt hiệu quả kinh tế cao. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng hệ thống plasmid pHT để khảo sát tinh chế protein chỉ thị CelA (endoglucanase A) dung hợp với CBM3a dưới dạng tiết trên *Bacillus subtilis* WB800N. Kết quả khảo sát cho thấy protein CelA được tiết ra môi trường nuôi cấy và có thể tinh chế thông qua việc gắn kết của CBM3a lên cơ chất Regenerated Amorphous Cellulose (RAC). Nghiên cứu này làm tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn về khả năng ứng dụng CBM3a làm đuôi tinh chế protein tái tổ hợp trên hệ thống biểu hiện *B. subtilis*.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, Cellulose Binding Module, *Clostridium thermocellum*, endoglucanase A, tinh chế protein

MỞ ĐẦU

Để thủy phân cellulose, vi khuẩn kỵ khí, ưa nhiệt *C. thermocellum* sử dụng phức hệ cellulosome có cấu tạo gồm một giá đỡ CipA và các enzyme phụ trợ [3]. CBM3a là module thuộc protein khung CipA giúp phức hệ cellulosome gắn vào sợi cellulose. Các biện pháp tinh chế protein tái tổ hợp sử dụng phổ biến hiện nay

thường có chi phí cao và hiệu suất thấp do giá thành của vật liệu cao và các hóa chất đắt tiền. Sajjad và cộng sự [3] đã chứng minh CBM3a dung hợp với CelA trong hệ thống biểu hiện nội bào *Escherichia coli* vẫn giữ được hoạt tính và có thể bám lên cơ chất cellulose giá rẻ Regenerated Amorphous Cellulose (RAC). Một kết quả

ngiên cứu khác cho thấy tinh chế protein GFP dung hợp với CBM3a ở *E. coli* cho hiệu suất tinh chế khá cao, 1 g RAC có khả năng hấp phụ 365 mg protein GFP dung hợp với CBM3a. Việc tách protein tái tổ hợp ra khỏi RAC rất dễ dàng và ít tốn kém bởi chất có tính hoạt động bề mặt như ethylene glycol hoặc glycerol [5]. Ngoài ra, cũng đã có nghiên cứu chứng minh có thể sử dụng CBM3-tag trong việc tinh chế protein dung hợp CBM3-intein-EGFP (enhanced green fluorescent protein) ở nấm men *Pichia pastoris* [11]. Do đó, CBM đã và đang được nghiên cứu để triển khai ứng dụng trong sản xuất, tinh chế protein tái tổ hợp đặc biệt là trên qui mô sản xuất lớn hoặc tinh chế protein từ dịch nuôi cấy có thể tích lớn.

Hệ thống biểu hiện ngoại bào ở *B. subtilis* với các ưu điểm như: (i) chủng vi sinh vật an toàn; (ii) có khả năng lên men ở mật độ cao; (iii) có khả năng hiệu quả tiết protein ra ngoài tế bào giúp dễ dàng cho việc tinh chế protein mục tiêu [1, 9, 10]. Tuy nhiên, các đuôi dung hợp thường bị chủng chủ loại bỏ, do đó chủng *B. subtilis* WB800N với đột biến bất hoạt 8 protease ngoại bào được sử dụng nhằm tăng cường hiệu quả biểu hiện. Bên cạnh đó, promoter *Pgrac* cảm ứng cho *B. subtilis* [8] được dung hợp từ promoter mạnh *groESL* có nguồn gốc từ *B. subtilis* với *lac* operator (*lacO*) từ *E. coli*, sử dụng chất cảm ứng là isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), cho khả năng biểu hiện protein mục tiêu lên đến 15 % protein tổng số, gấp 50 lần so với *Pspac* [9]. Để có thể ứng dụng đặc tính bám cơ chất cellulose của CBM3a trong tinh chế protein tái tổ hợp trên hệ thống biểu hiện *B. subtilis*, trong nghiên cứu này CBM3a được dung hợp với protein CelA nhằm khảo sát khả năng biểu hiện tiết của protein tái tổ hợp và nghiên cứu đặc tính bám của protein tái tổ hợp CBM3a-CelA lên cơ chất RAC. Nghiên cứu này làm tiền đề cho các nghiên cứu ứng dụng đuôi tinh chế CBM3a trong biểu hiện, tinh chế protein tái tổ hợp dưới dạng

nội bào hoặc ngoại bào trong hệ thống biểu hiện *B. subtilis*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật, plasmid và môi trường nuôi cấy

Chủng *E. coli* OmniMAX™(F' {*proAB+lacIqlacZ* Δ M15Tn10(TetR) Δ (*ccdAB*)}) *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80(*lacZ*) Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169*endA1recA1supE44thi-1gyrA96relA1tonApanD*) (Invitrogen) [6] được sử dụng làm chủng chủ trong các bước dòng hóa. Chủng *B. subtilis* WB800N đột biến loại bỏ 8 protease ngoại bào được sử dụng để biểu hiện protein mục tiêu dưới dạng tiết, giúp giảm sự phân hủy protein mục tiêu khi tiết ra môi trường [7].

Plasmid pHT43 chứa trình tự tín hiệu tiết *SamyQ* của α -amylase, pHT43 không mang gen *cbm3a* và *celA* được sử dụng làm đối chứng âm trong quá trình kiểm tra biểu hiện protein tái tổ hợp. Plasmid pHT43-*celA* [4] (Hình 1) chứa trình tự tín hiệu tiết *SamyQ* và gen *celA* được sử dụng làm khung sườn để thiết kế plasmid pHT1733 chứa CelA dung hợp CBM3a. Ngoài ra pHT43-*celA* còn được dùng làm mẫu đối chứng trong quá trình chứng minh đặc tính gắn của CBM3a lên RAC.

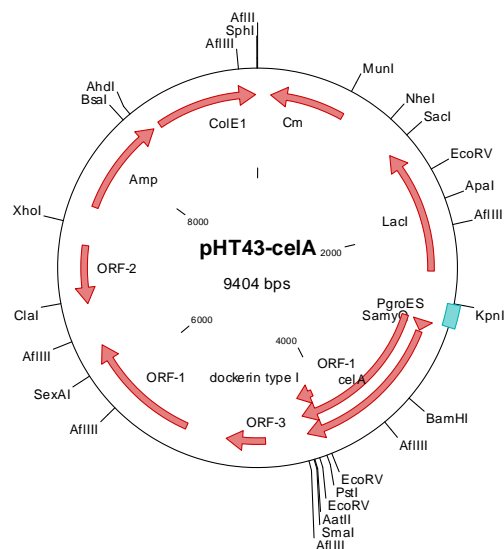
Tế bào được nuôi cấy lắc trên môi trường Luria Broth (LB) ở 37 °C, kháng sinh được thêm vào với nồng độ tương ứng (Ampicillin 100 μ g/mL đối với *E. coli* và Chloramphenicol 10 μ g/mL đối với *B. subtilis*). Tế bào được trải trên môi trường thạch chứa 0,5 % carboxymethyl cellulose (CMC) để sàng lọc khả năng tiết CelA-CBM3a.

Sàng lọc và biểu hiện CelA-CBM3a

Sàng lọc chủng có khả năng biểu hiện protein tái tổ hợp

Chủng *B. subtilis* WB800N mang plasmid tái tổ hợp pHT1733 được sàng lọc trên môi trường LB-agar có bổ sung kháng sinh Chloramphenicol

và cơ chất CMC, ủ đĩa ở 30 °C trong 24 giờ, nhuộm đĩa với thuốc thử Congo Red. Chọn khuẩn lạc có khả năng biểu hiện protein tái tổ hợp thông qua vòng phân giải CMC xung quanh khuẩn lạc. Thực hiện tương tự với mẫu đối chứng (-) là chủng *B. subtilis* mang plasmid pHT43 không biểu hiện CelA.



Hình 1. Sơ đồ plasmid pHT43-celA.

Biểu hiện protein tái tổ hợp CelA-CBM3a

Chủng *B. subtilis* WB800N mang plasmid tái tổ hợp pHT1733 được nuôi cấy trên môi trường LB có bổ sung kháng sinh chloramphenicol ở 30 °C và lắc với tốc độ 250 vòng/phút, tiến hành cảm ứng biểu hiện bằng IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) khi OD₆₀₀ đạt 0,8 với các nồng độ 0,001 mM ; 0,01 mM; 0,1 mM và 1 mM. Mẫu được thu ở 6 giờ, 12 giờ, 18 giờ và 24 giờ sau khi cảm ứng. Thực hiện tương tự với mẫu đối chứng âm là chủng *B. subtilis* WB800N mang plasmid pHT43. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần trên 3 khuẩn lạc khác nhau. Mẫu sau khi thu được ly tâm 13.000 vòng/ phút trong 5 phút để loại bỏ tế bào. Xác định điều kiện biểu hiện CelA-CBM3a tốt nhất dựa trên hoạt tính thủy phân cơ chất CMC 0,5 % trong dung dịch đệm succinate

50 mM có bổ sung 10 mM CaCl₂ bằng phương pháp DNS [4].

Chứng minh CelA-CBM3a biểu hiện tiết từ *B. subtilis* có khả năng bám lên cơ chất RAC

Để có thể chứng minh khả năng bám của CelA-CBM3a lên cơ chất cellulose, hút 1200 μ L dịch nuôi cấy có chứa protein tái tổ hợp CelA-CBM3a đã loại bỏ tế bào được ký hiệu là (S) vào 600 μ L RAC 0,5 % pha trong đệm succinate 50 mM có bổ sung 10 mM CaCl₂, ủ trong đá 30 phút cho CelA-CBM3a bám lên RAC nhưng ức chế hoạt tính phân cắt RAC của CelA-CBM3a. Ly tâm 6.000 g trong 5 phút, thu 2 phân đoạn: phân đoạn dịch nổi chỉ có CelA-CBM3a được ký hiệu là (S1) và phân đoạn tủa chứa RAC và CelA-CBM3a bám lên RAC được ký hiệu là (P1). Tiến hành đo hoạt tính thủy phân CMC 0,25 % của dịch nuôi cấy (S) và phân đoạn dịch nổi (S1) bằng phương pháp DNS. Hiệu số giữa hoạt tính thủy phân CMC của dịch nuôi cấy (S) và phân đoạn dịch nổi (S1) chính là hoạt tính của CelA-CBM3a đã bám lên cơ chất RAC trong pha tủa (P1). Thực hiện tương tự trên mẫu đối chứng CelA không dung hợp với CBM3a. Ngoài ra, sự hiện diện của CelA-CBM3a trong pha tủa với RAC (P1) và pha tan (S1) còn được xác định bằng phương pháp Western Blot với kháng thể sơ cấp là kháng thể thô anti-CelA và kháng thể thứ cấp là kháng thể anti-rabbit IgG-HRP từ thô, phát hiện vạch lai với kháng thể bằng phản ứng tạo màu với tetramethylpentadecane (TMPD).

Tinh chế CelA-CBM3a dựa trên ái lực giữa CBM3a và RAC

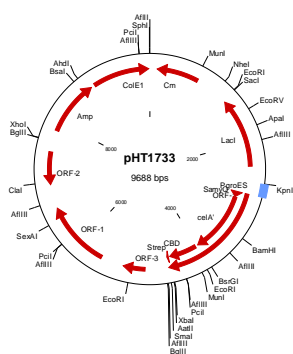
Phương pháp thực hiện tương tự như phương pháp chứng minh hoạt tính gắn của CBM3a lên RAC. Thể tích dịch nuôi cấy là 500 mL. Phân đoạn tủa (P1) chứa RAC và CelA-CBM3a được rửa 3 lần với đệm succinate 50 mM có bổ sung 10 mM CaCl₂ để loại bỏ protein tạp. Các phân đoạn rửa được thu nhận và tủa bằng Trichloroacetic acid TCA 10 % (W1, W2, W3) nhằm kiểm tra mức độ rửa trôi của CelA-CBM3a

ra khỏi RAC. Protein CelA-CBM3a hấp phụ trên bề mặt RAC được dung ly bởi glycerol 100 % bằng cách huyền phù phân đoạn tủa sau khi rửa trong đệm succinate 50 mM có bổ sung 10 mM CaCl₂ sao cho được thể tích 30 mL và thêm glycerol 100 % vào với thể tích gấp 4 lần thể tích huyền phù RAC. Ly tâm 18.000 g trong 15 phút và thu 2 phân đoạn: phân đoạn dịch nổi chính là protein CelA-CBM3a dung ly ra khỏi RAC được ký hiệu là (P2A); phân đoạn tủa gồm RAC và một số CelA-CBM3a còn bám lại trên RAC được ký hiệu là (P2R). Các phân đoạn trên được xử lý để thực hiện điện di SDS-PAGE và Western blot.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết kế plasmid tái tổ hợp pHT1733 mang gen *celA* dung hợp với *cbm3a*

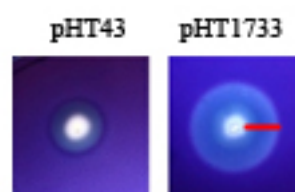
Plasmid pHT1733 được thiết kế từ việc chèn gen *cbm3a* từ *C. thermocellum* ATCC27405 vào plasmid pHT43-*celA* tại vị trí cắt của 2 enzyme cắt giới hạn *BsrGI* và *SmaI* tạo đoạn dung hợp *samyQ-celA-cbm3a*. Vùng trình tự đoạn chèn *cbm3a* trên plasmid tái tổ hợp pHT1733 cũng đã được kiểm tra bằng phương pháp giải trình tự và cho kết quả tương đồng 100 % với trình tự thiết kế lý thuyết (Hình 2 và Hình P1 phần Phụ lục). Plasmid pHT1733 được dùng để biến nạp vào chủng chủ biểu hiện *B. subtilis* WB800N nhằm biểu hiện protein CelA-CBM3a dưới dạng tiết ra môi trường nuôi cấy nhờ tín hiệu tiết *SamyQ*.



Hình 2. Sơ đồ plasmid pHT1733.

Sàng lọc và biểu hiện CelA-CBM3a

Khi cấy đồng thời 2 chủng *B. subtilis* WB800N mang plasmid tái tổ hợp pHT1733 và plasmid đối chứng (-) pHT43 trên cùng một đĩa môi trường LB-Agar-Cm có bổ sung 0,25 % CMC và 0,1 mM IPTG, ủ ở 30 °C trong 24 giờ, nhuộm đĩa với thuốc thử Congo Red. Kết quả trên Hình 3 cho thấy khuẩn lạc vi khuẩn mang plasmid pHT1733 tạo vòng phân giải CMC lớn so với đối chứng (-). Chúng tôi đã chọn lọc được chủng *B. subtilis* WB800N mang plasmid pHT1733 cho phép biểu hiện protein CelA-CBM3a dưới dạng tiết ra môi trường nuôi cấy.

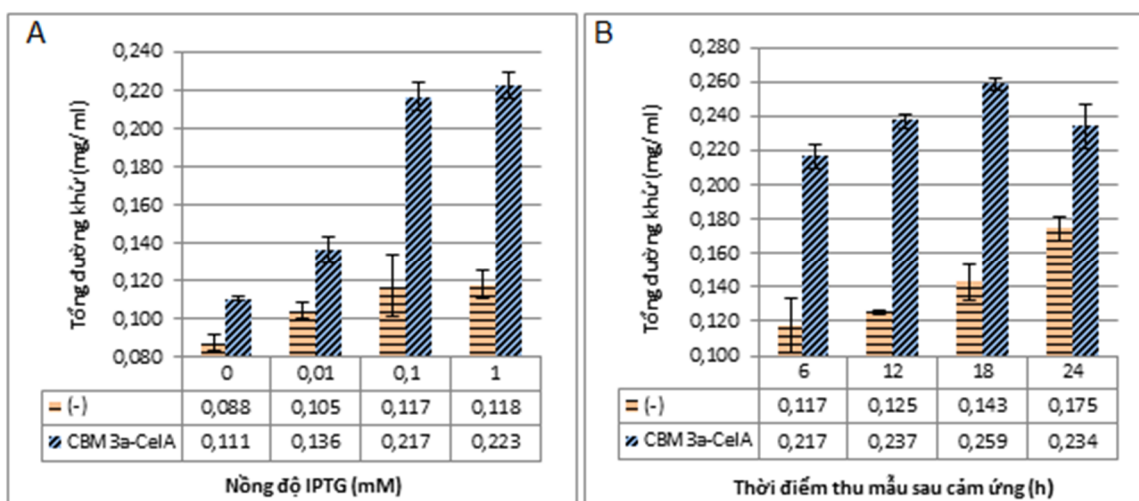


Hình 3. Kết quả sàng lọc chủng có khả năng tiết enzyme phân cắt CMC tạo vòng phân giải CMC. pHT43 : khuẩn lạc *B. subtilis* WB800N mang plasmid pHT43 không biểu hiện enzyme làm mẫu đối chứng () ; pHT1733 : khuẩn lạc *B. subtilis* WB800N mang plasmid pHT1733 cho phép biểu hiện enzyme CelA-CBM3a dưới dạng tiết.

Để thu được lượng protein tái tổ hợp CelA-CBM3a đủ để nghiên cứu khảo sát đặc tính bám của CBM3a lên cơ chất RAC, cần khảo sát điều kiện cảm ứng biểu hiện phù hợp nhất cho chủng *B. subtilis* WB800N mang plasmid pHT1733 đã được sàng lọc bên trên. Nhiệt độ nuôi cấy ở 30 °C ứng với điều kiện sản xuất được chọn để khảo sát với nồng độ chất cảm ứng thay đổi 0 mM; 0,01 mM; 0,1 mM và 1 mM trong 6 giờ cảm ứng. Kết quả Hình 4A cho thấy hoạt tính phân giải CMC ở chủng *B. subtilis* WB800N mang plasmid pHT1733 luôn cho hoạt tính phân giải CMC cao hơn mẫu đối chứng và nồng độ chất cảm ứng IPTG 0,1 mM là nồng độ tốt nhất cho việc cảm ứng biểu hiện CelA-CBM3a. Ở điều kiện cảm ứng IPTG 0,1 mM khi thời gian cảm ứng khác

nhau hoạt tính enzyme có khác nhau nhưng không nhiều. Thời gian cảm ứng tốt nhất là 18 giờ (Hình 4B). Như vậy các thí nghiệm tiếp theo,

chúng được nuôi cấy ở 30 °C, cảm ứng bằng 0,1 mM IPTG trong 18 giờ.



Hình 4. Khảo sát điều kiện cảm ứng biểu hiện C_{el}A-CBM3a dạng tiết sử dụng chủng *B. subtilis* WB800N thông qua hoạt tính phân cắt CMC. A: Tổng đường khử (mg/mL) trung bình của 2 khuẩn lạc nuôi cấy ở 30 °C ở các nồng độ IPTG 0 đến 1 mM tại thời điểm thu mẫu sau cảm ứng 6 giờ; B: Tổng đường khử (mg/mL) trung bình của 2 khuẩn lạc nuôi cấy ở 30 °C, nồng độ IPTG 0,1 mM ở các thời điểm khác nhau.

Chứng minh C_{el}A-CBM3a biểu hiện tiết từ *B. subtilis* có khả năng bám lên cơ chất RAC

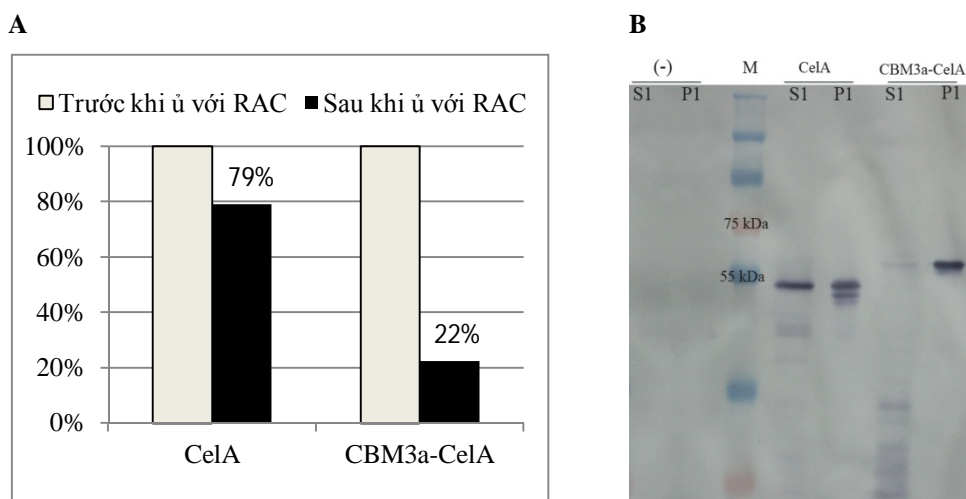
Dịch nuôi cấy đã được kiểm tra không có khả năng thủy phân cơ chất RAC ở nhiệt độ 4 °C (kết quả không trình bày), đây là điều kiện để tiến hành thí nghiệm ủ dịch nuôi cấy với RAC cho CBM3a-C_{el}A gắn lên RAC mà không phân cắt RAC. Từng phân đoạn enzyme được xác định lại hàm lượng enzyme thông qua hoạt tính của enzyme trên cơ chất CMC 0,25 %. Kết quả Hình 5A cho thấy sau khi ủ với RAC, trong phân đoạn dịch nổi (S1) hoạt tính của cả 2 mẫu dịch tiết chứa C_{el}A và mẫu dịch tiết chứa C_{el}A-CBM3a đều cho hoạt tính enzyme phân cắt CMC giảm so với mẫu trước khi ủ với RAC. Điều này chứng tỏ cả 2 loại enzyme này đều có khả năng gắn với cơ chất RAC nên một số enzyme đã bị lắng xuống cùng với RAC trong pha tủa (P1) nên làm giảm lượng enzyme trong pha tan (S1). Tuy nhiên hoạt tính trong pha tan S1 sau khi ủ với RAC của mẫu

đối chứng chỉ chứa enzyme C_{el}A giảm 21 % so với hoạt tính enzyme trước khi ủ với RAC, hoạt tính bám của C_{el}A lên cơ chất RAC trong trường hợp này có lẽ là do tương tác giữa enzyme và cơ chất. Trong khi đó, hoạt tính trong pha tan S1 sau khi ủ với RAC của mẫu chứa enzyme C_{el}A-CBM3a giảm đến 78 % so với hoạt tính enzyme trước khi ủ với RAC, hoạt tính bám của C_{el}A lên cơ chất RAC trong trường hợp này so với mẫu đối chứng (C_{el}A) là do tương tác của CBM3a lên cơ chất RAC. CBM3a trong CBM3a-C_{el}A có hoạt tính bám RAC được xác định một lần nữa bằng phương pháp Western blot (Hình 5B).

Kết quả Western blot trên Hình 5B cho thấy sự khác biệt rõ giữa khả năng bám của CBM3a-C_{el}A lên cơ chất RAC so với trường hợp C_{el}A không dung hợp với CBM3a. Khi ủ với kháng thể đặc hiệu với C_{el}A, tín hiệu chỉ xuất hiện khi protein mục tiêu là C_{el}A hoặc phải dung hợp với C_{el}A. Do vậy, phân đoạn dịch nổi sau khi ủ với

RAC (S1) và phân đoạn tủa sau khi ủ với RAC (P1) của mẫu đối chứng âm (-) không chứa CelA đều không cho tín hiệu với kháng thể kháng CelA (Hình 5B, (-)). Kết quả này cho thấy kháng thể kháng CelA không bắt chéo với bất kỳ protein nào khác tiết ra từ chủng *B. subtilis* WB800N. Trong khi đó, phân đoạn dịch nổi sau khi ủ với RAC (S1) và phân đoạn tủa sau khi ủ với RAC

(P1) của mẫu chứa CelA và CBM3a-CelA đều cho tín hiệu lai trên màng lai. Tuy nhiên, tín hiệu lai rất khác biệt giữa 2 phân đoạn của 2 mẫu này. Đối với mẫu chứa CelA tín hiệu lai xuất hiện đều trên cả 2 phân đoạn S1 và P1, trong khi mẫu chứa CBM3a-CelA tín hiệu lai hầu như chỉ xuất hiện trong phân đoạn tủa với RAC (P1) và tín hiệu rất thấp trong phân đoạn dịch nổi S1.



Hình 5. Chứng minh tính bám của CelA-CBM3a biểu hiện tiết từ *B. subtilis* lên cơ chất RAC. (A) độ giảm hoạt tính phân giải CMC (%) của dịch nuôi cấy chứa enzyme sau khi ủ với RAC so với mẫu trước khi ủ với RAC; (B) Western blot với kháng thể kháng CelA; M: thang protein chuẩn; S1: phân đoạn dịch nổi của dịch nuôi cấy sau khi ủ với RAC; P1: phân đoạn tủa chứa RAC và enzyme bám với RAC sau khi ủ dịch nuôi cấy với RAC; (-) mẫu đối chứng âm không chứa enzyme CelA cũng như CBM3a.

Như vậy, tương tác giữa CelA và RAC không bền chặt như trường hợp CelA-CBM3a. Do CelA chỉ liên kết với cơ chất để thực hiện phản ứng, còn CelA-CBM3a ngoài tương tác giữa CelA và RAC còn có tương tác của CBM3a gắn chuyên biệt và hiệu quả với cơ chất RAC.

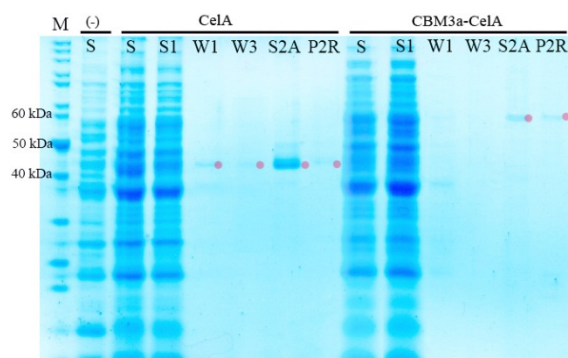
Tinh chế CelA - CBM3a dựa trên ái lực giữa CBM3a và RAC

CBM3a đã được chứng minh có thể liên kết mạnh với cơ chất RAC, tuy nhiên tương tác này có dễ dàng để ứng dụng trong tinh chế trực tiếp protein tái tổ hợp từ dịch nuôi cấy thể tích lớn và liên kết này có đủ bền để đảm bảo độ bám dính của protein mục tiêu qua những bước rửa nghiêm

ngặt để đạt được độ tinh sạch cao của protein mục tiêu sau tinh chế hay không thì cần được chứng minh qua thử nghiệm tinh chế protein tái tổ hợp CelA-CBM3a bằng các hạt RAC. Kết quả SDS-PAGE và Western blot trên Hình 6B cho thấy, so với dịch nuôi cấy trước khi ủ RAC (S) thì lượng protein CelA và CBM3a-CelA giảm đi nhiều so với phân đoạn dịch nổi sau khi ủ với RAC (S1). Trong đó, ở giếng S1 của dịch nuôi cấy chứa CBM3a-CelA hầu như không phát hiện protein mục tiêu. Chứng tỏ protein mục tiêu đã gắn hoàn toàn lên RAC. Trong khi giếng S1 của dịch nuôi cấy chứa CelA thì vẫn cho tín hiệu lai rõ.

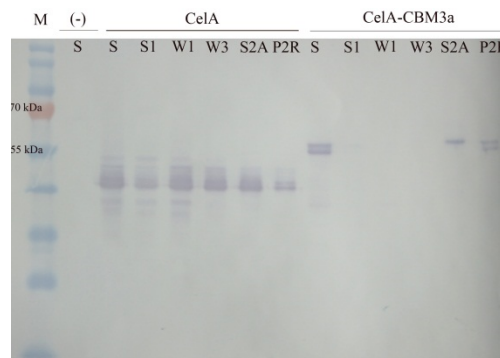
Ở các phân đoạn rửa (W1, W3), chỉ có mẫu chứa CelA cho tín hiệu lai với kháng thể kháng CelA trong tất cả các phân đoạn rửa. Như vậy, CelA tuy có khả năng gắn lên RAC nhưng sự liên kết này không chặt chẽ (tương tác enzyme-cơ chất trong phản ứng) nên CelA dễ dàng bị tách khỏi RAC trong quá trình rửa. Ngược lại, tín hiệu lai không xuất hiện ở các phân đoạn rửa của mẫu

A



chứa CBM3a-CelA, mà chỉ xuất hiện vạch lai trong phân đoạn dung ly (S2A) và phân đoạn tủa RAC còn lại sau dung ly (P2R). Như vậy, CBM3a giúp cho protein tái tổ hợp CelA-CBM3a bám rất chặt và đặc hiệu lên cơ chất RAC. Vì thế, CBM3a có thể ứng dụng trong tinh chế protein tái tổ hợp.

B



Hình 6. Kết quả thí nghiệm chứng minh khả năng ứng dụng đuôi CBM3a trong tinh chế protein tái tổ hợp trên cơ chất RAC. (A) Kết quả SDS-PAGE và (B) Western blot với kháng thể kháng CelA; M: thang protein chuẩn; S: phân đoạn dịch nuôi cấy trước khi ủ với RAC; S1: phân đoạn dịch nổi sau khi ủ với RAC; W1, W3: các phân đoạn sau khi rửa; S2A: phân đoạn protein được dung ly ra khỏi RAC trong glycerol; P2R: phân đoạn protein còn bám lại trên RAC sau khi dung ly bằng glycerol.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã tạo được plasmid pHT1733 mang đoạn gen *cbm3a* dung hợp với *celA*. Protein tái tổ hợp CBM3a-CelA đã được biểu hiện dưới dạng tiết có hoạt tính thủy phân cellulose vô định hình, đặc biệt là đuôi dung hợp CBM3a có ái lực cao với cơ chất RAC. Đây là tiền đề có ý nghĩa trong việc xây dựng phương pháp tinh chế protein tái tổ hợp thông qua đuôi tinh chế CBM3a trên cơ chất RAC, nhằm giảm chi phí và đơn giản hóa quá trình sản xuất protein

tái tổ hợp với quy mô lớn, đặc biệt là protein tái tổ hợp tiết ra môi trường nuôi cấy với thể tích lớn. Tuy nhiên, để ứng dụng đuôi tinh chế CBM3a cho hệ thống biểu hiện tinh chế protein tái tổ hợp trên *B. subtilis* cần có nhiều khảo sát tiếp theo trên các protein chỉ thị khác cũng như hệ thống biểu hiện nội bào và ngoại bào.

Lời cảm ơn: Một phần nghiên cứu của đề tài này được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh, mã số đề tài: C2014-18-19.

Using cellulose binding module of CBM3A as the purification tag for secreted Endoglucanase A (CelA) in *Bacillus subtilis*

- Nguyen Hoang Ngoc Phuong
 - Nguyen Thanh Phuoc
 - Pham Luong Thang
 - Nguyen Duc Hoang
 - Tran Linh Thuoc
 - Phan Thi Phuong Trang
- University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Traditional methods of recombinant protein purification are uneconomic and inconvenient to the secreted proteins at large-volume. CBM3a, a module from cellulosome's scaffoldin of *Clostridium thermocellum*, directs the binding of the cellulase complex on the cheap cellulose substrate. Most of previous studies about CBM3a fused with cellulases as the purification tag were conducted in intracellular *Escherichia coli* system. In this research, we used the

Key words: *Bacillus subtilis*, Cellulose Binding Module, *Clostridium thermocellum*, endoglucanase A, protein purification

extracellular *Bacillus subtilis* WB800N expression system to investigate the CBM3a-tag fused with endoglucanase CelA into plasmid pHT. The results indicated that protein CelA was secreted and purified by CBM3a-tag binding on the Regenerated Amorphous Cellulose (RAC) substrate. This can be used for further improvement in protein purification tag designing.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. C.R. Harwood, *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses, *Trends Biotechnol*, 10, 247-256 (1992).
- [2]. M. Sajjad, M.I. Mahmood Khan, R. Zafar, S. Ahmad, U. Niazi, M.W. Akhtar, Influence of positioning of carbohydrate binding module on the activity of endoglucanase CelA of *Clostridium thermocellum*, *J Biotechnol*, 161, 3, 206-212 (2012).
- [3]. C.M. Fontes, H.J. Gilbert, Cellulosomes: highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates, *Annu Rev Biochem*, 79, 655-681 (2010).
- [4]. T.K. Ghose, Measurement of cellulase activities, *Pure and Applied Chemistry*, 59, 2, 12 (1987).
- [5]. J. Hong, X. Ye, Y. Wang, Y.H. Zhang, Bioseparation of recombinant cellulose-binding module-proteins by affinity adsorption on an ultra-high-capacity cellulosic adsorbent, *Anal Chim Acta*, 621, 2, 193-199 (2008).
- [6]. H.D. Nguyen, T.T. Phan, W. Schumann, Analysis and application of *Bacillus subtilis* sortases to anchor recombinant

- proteins on the cell wall, *AMB Express*, 1, 1, 22 (2011).
- [7]. T.T. Phan, H.D. Nguyen, W. Schumann, Novel plasmid-based expression vectors for intra- and extracellular production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*, *Protein Expr Purif*, 46, 2, 189-195 (2006).
- [8]. M. Schallmey, A. Singh, O.P. Ward, Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production, *Can J Microbiol*, 50, 1, 1-17 (2004).
- [9]. W. Schumann, Production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*, *Adv Appl Microbiol*, 62, 137-189 (2007).
- [10]. W. Wan, D. Wang, X. Gao, J. Hong, Expression of family 3 cellulose-binding module (CBM3) as an affinity tag for recombinant proteins in yeast, *Appl Microbiol Biotechnol*, 91, 3, 789-798 (2011).

PHỤ LỤC



Hình P1. Kết quả giải trình tự plasmid pHT1733 bằng môi ON314 nằm ngoài đoạn gene cbm3a dung hợp ở đầu 3' của gene celA.