

Khảo sát sự biểu hiện của GFP được dung hợp với HIS-TAG tại đầu N hoặc C sử dụng plasmid pHT253 và pHT254 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 15 tháng 09 năm 2014, nhận đăng ngày 26 tháng 01 năm 2015)

TÓM TẮT

Hệ thống các plasmid mang promoter mạnh *Pgrac100*, pHT253 và pHT254 được thương mại hóa trên thị trường thế giới vào năm 2012 đã góp phần thúc đẩy việc sử dụng *Bacillus subtilis* làm chủng chủ trong biểu hiện protein tái tổ hợp. Ngoài đặc điểm mang một promoter mạnh, hai plasmid này còn được tích hợp thêm đuôi tinh chế His-tag ở trước vùng MCS (Multi Cloning Site) trong pHT253 (*Pgrac100-8xHis-MCS*) và sau vùng MCS trong pHT254 (*Pgrac100-MCS-8xHis*) giúp thuận lợi cho việc tinh chế và phát hiện protein mục tiêu. Tùy từng protein mục tiêu

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, GFP, His-tag, *Pgrac100*, pHT253, pHT254.

mà người sử dụng lựa chọn chiến lược dung hợp His-tag vào đầu N hoặc C của protein sao cho hiệu quả. Trong nghiên cứu này, GFP được chọn như một gen chỉ thị nhằm khảo sát ảnh hưởng vị trí dung hợp của His-tag lên sự biểu hiện trong *B. subtilis*. Kết quả cho thấy sự biểu hiện của GFP trong *B. subtilis* giảm mạnh khi dung hợp với His-tag tại đầu N. Đây sẽ là thông tin quan trọng giúp định hướng sử dụng cũng như thiết kế thí nghiệm trong biểu hiện tinh chế protein tái tổ hợp.

MỞ ĐẦU

Pgrac100 là một promoter mạnh cho *Bacillus subtilis*, được đưa vào sử dụng đầu tiên trong plasmid pHT100, đã cho mức độ biểu hiện protein mục tiêu lên đến 30 % so với protein tổng [1]. Vốn là promoter thế hệ thứ 2, kế thừa những ưu điểm của promoter *Pgrac* [2], *Pgrac100* mang những cải tiến (i) vùng UP element giàu AT, (ii) vùng -35 mang trình tự bảo hòa TTGACA và (iii) vùng -15 mang trình tự ATG cho mức độ phiên mã tăng gấp 40 lần [1] so với *Pgrac*. Những kết quả khả quan về mức độ biểu hiện đã cho thấy

tiềm năng to lớn của *Pgrac100*, góp một phần không nhỏ vào việc phát triển của hệ thống biểu hiện pHT trên *B. subtilis*. Cùng với những ưu điểm vốn có như an toàn trong thực phẩm, lên men ở mật độ cao, khả năng tiết hiệu quả [3], thì việc sở hữu một hệ thống biểu hiện mạnh đã giúp *B. subtilis* trở thành một chủng chủ khá hấp dẫn trong lĩnh vực sản xuất protein tái tổ hợp.

Bên cạnh việc lựa chọn một hệ thống biểu hiện phù hợp, cho sản lượng protein cao thì hiệu quả tinh sạch cũng là một nhu cầu quan trọng

trong sản xuất protein tái tổ hợp. Với mục tiêu tạo thuận lợi cho quá trình tinh sạch protein, ngoài việc sử dụng promoter mạnh *Pgrac100*, hệ thống vector pHT còn được dung hợp thêm đuôi tinh sạch 8xHis-tag vào trước và sau vùng MCS, tạo ra hai phiên bản pHT253 (*Pgrac100-8xHis-MCS*) và pHT254 (*Pgrac100-MCS-8xHis*) được phân phối trên thị trường thế giới [4], cho phép biểu hiện protein mục tiêu dưới dạng dung hợp 8xHis-tag vào đầu N hoặc đầu C, theo thứ tự. Vốn là một đuôi tinh chế phổ biến, 8xHis-tag mang nhiều ưu điểm như kích thước nhỏ, có thể được tinh chế dưới điều kiện biến tính, hiệu quả tinh sạch cao và dễ dàng dòng hóa [5]. Tuy nhiên, sự biểu hiện của protein mục tiêu có thể sẽ bị ảnh hưởng bởi vị trí của 8xHis-tag khi dung hợp vào đầu N hoặc C [6]. Do đó, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của đuôi tinh chế 8xHis-tag lên sự biểu hiện của GFP (Green Fluorescent Protein) khi dung hợp vào đầu N hoặc C trong *B. subtilis*, trong trường hợp này GFP như một protein chỉ thị. Ảnh hưởng của đuôi tinh chế His-tag lên sự biểu hiện protein mục tiêu 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

Chủng vi sinh vật, plasmid và môi trường nuôi cấy

E. coli OmniMAX (Invitrogen) được sử dụng ở bước dòng hóa và *B. subtilis* 1012 được dùng để đánh giá ảnh hưởng của 8xHis-tag lên sự biểu hiện của GFP trong thí nghiệm này. Các plasmid được sử dụng bao gồm pHT254 chứa promoter *Pgrac100* và gen *8xHis* nằm sau vùng MCS; plasmid pHT1169 đã được tạo ra trong một đề tài khác bằng cách chèn gen chỉ thị *gfp* vào vùng MCS của plasmid pHT253 (có cấu trúc tương tự pHT254 nhưng gen *8xHis* nằm trước vùng MCS). 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 pHT1170

Đoạn gen *gfp* được thu nhận bằng kỹ thuật PCR với khuôn là pHT10-*gfp*⁺ [3] và cặp mồi ON1277(5'AAAGGAGGAAGGATCCATGGCTAGCAAAGGAGAAGAAGACT-3'), ON1278(5'-GGCCATGACGTCTTTGTAAAGCTCATCCATGCCATGTGT-3'). Sản phẩm PCR được xử lý với 2 enzyme *Bam*HI và *Aat*II và nối vào pHT254 cũng đã được xử lý cùng loại enzyme tạo thành vector pHT1170 (Hình 1B). Quá trình sàng lọc được thực hiện trong *E. coli* Omni MAX với mồi ON1249(5'-CGTTTCCACCGGAA TTAGCTTG-3'), ON1359 (5'ACGTACGATCTTCAGCCGACTC-3'), plasmid đúng được biến nạp vào *B. subtilis* 1012.

Khảo sát hoạt tính GFP trên môi trường rắn

Các khuẩn lạc đơn *B. subtilis* chứa plasmid pHT1169, pHT1170 được khảo sát khả năng biểu hiện GFP nhằm đánh giá ảnh hưởng của 8xHis-tag. Chấm các khuẩn lạc *B. subtilis* lên đĩa LB-Agar-Cm với 6 nồng độ IPTG (0 mM; 0,001 mM; 0,01 mM; 0,1 mM; 0,5 mM và 1 mM). Ủ ở 37 °C trong 16 giờ. Sự phát huỳnh quang của khuẩn lạc được kích thích dưới bước sóng UV, mức độ phát huỳnh quang phản ánh mức độ biểu hiện của GFP, qua đó đánh giá được mức độ biểu hiện của GFP tái tổ hợp với His-tag. 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 chủng âm là pHT01. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần trên 3 khuẩn lạc khác nhau.

Cảm ứng biểu hiện GFP

Chủng *B. subtilis* 1012 chứa các plasmid pHT1169, pHT1170 được nuôi cấy trong môi trường LB chứa kháng sinh chloramphenicol (10 µg/ml) ở 37 °C và tốc độ lắc 250 vòng/phút. Cảm ứng bằng IPTG tại thời điểm OD₆₀₀ đạt 0,8 – 1 với các nồng độ 0 mM; 0,001 mM; 0,01 mM; 0,1 mM; 0,5 mM và 1 mM. Thu mẫu ở 0, 2, 4 giờ sau

cảm ứng, ly tâm 6000 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 mẫu chứng 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 60 µlPBS (Phosphate Buffer Saline), thêm lysozyme đạt nồng độ cuối là 1 µg/µl, 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 để tiến hành điện di SDS-PAGE. Đánh giá ảnh hưởng của His-tag tại đầu N và đầu C lên sự biểu hiện của GFP.

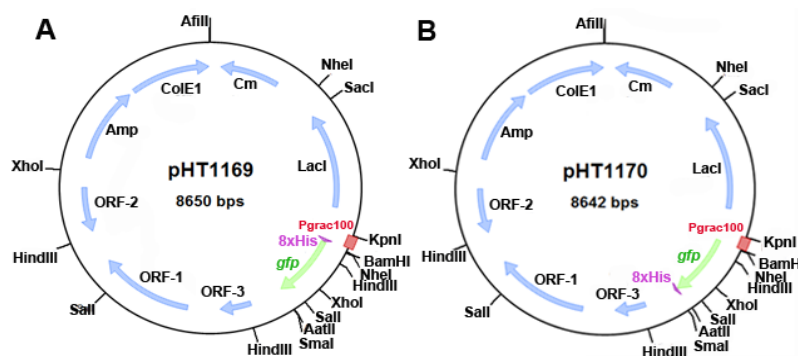
Khảo sát hoạt tính GFP trên đĩa 384 giếng

Khả năng phát quang của GFP liên quan tới một cấu trúc Chromophore, được tạo thành bởi 3 acid amin 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

trường 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 [7]. 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) với nồng độ lysozyme 10 µg/µl, ủ lắ trong 30 phút. Dịch chiết tế bào 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

Để đánh giá ảnh hưởng của His-tag lên khả năng biểu hiện GFP, chúng tôi thiết kế plasmid pHT1170 được điều hòa phiên mã bởi promotor *Pgrac100*, cho phép biểu hiện protein GFP dung hợp với 8xHis-tag tại đầu C của protein với các phương pháp đã được đề cập ở phần Vật liệu phương pháp. Trong nghiên cứu này, plasmid pHT1169 (Hình 1A) được sử dụng như một đối chứng do có cấu trúc tương tự pHT1170 (Hình 1B), nhưng 8xHis-tag sẽ được gắn vào đầu N của GFP ở dạng dung hợp. Các chủng *B. subtilis* 1012/pHT1169 (*Pgrac100-8xHis-gfp*) và *B. subtilis* 1012/pHT1170 (*Pgrac100-gfp-8xHis*) sẽ được giữ chủng và sử dụng cho các thí nghiệm khảo sát ở phần sau. Bằng cách so sánh hai dạng dung hợp 8xHis-GFP và GFP-8xHis, chúng tôi sẽ đánh giá được ảnh hưởng của His-tag lên sự biểu hiện và phát huỳnh quang của GFP.

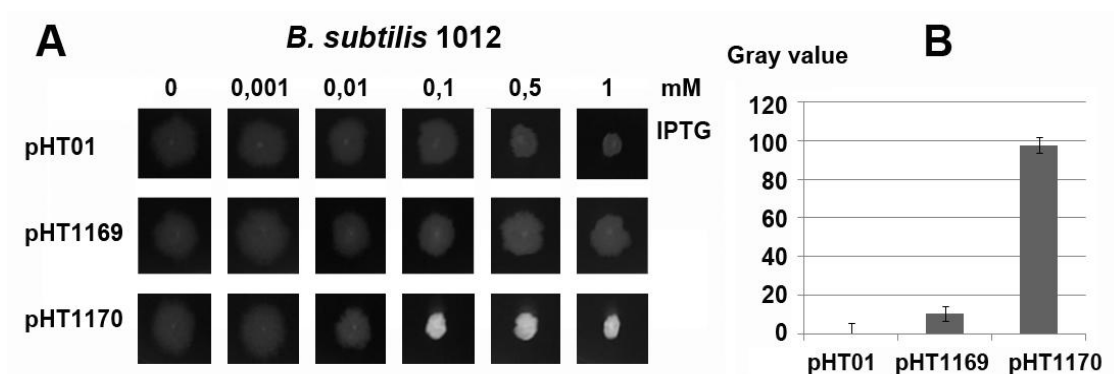


Hình 1. Sơ đồ plasmid pHT1169 (A) và pHT1170 (B), với vị trí gen 8xHis ở trước và sau gen gfp, tạo 2 dạng dung hợp 8xHis-GFP và GFP-8xHis theo thứ tự.

Đánh giá ảnh hưởng của 8xHis-tag khi nuôi cấy chủng trên môi trường rắn

Khả năng biểu hiện GFP của hai chủng *B. subtilis* 1012 mang plasmid pH1169 và pHT1170 được quan sát thông qua khả năng phát huỳnh quang khi chấm khuẩn lạc trên các đĩa thạch chứa kháng sinh và 6 nồng độ IPTG khác nhau. Kết quả sau khi ủ 16 giờ qua đêm ở 37 °C được ghi nhận như ở Hình 2A. Giá trị cường độ sáng của khuẩn lạc được tính toán bằng phần mềm AlphaEase, qua đó phản ánh mức độ biểu hiện GFP (Hình 2B).

Quan sát kết quả Hình 2, chúng tôi nhận thấy độ sáng của pHT1169 so với chứng âm pHT01 thì không có sự khác biệt nhiều ở tất cả các nồng độ IPTG. Trong khi đó, pHT1170 cho khả năng phát huỳnh quang mạnh và tăng dần theo nồng độ chất cảm ứng, đạt cực đại ở những nồng độ cao (0,1; 0,5 và 1 mM IPTG). Mức độ biểu hiện thấp của chủng mang plasmid pHT1169 so với pHT1170 cho thấy His-tag có ảnh hưởng đến protein mục tiêu, cụ thể là việc dung hợp vào đầu N làm giảm sự biểu hiện của GFP. Kết quả này sẽ được kiểm chứng bằng các thí nghiệm tiếp theo.

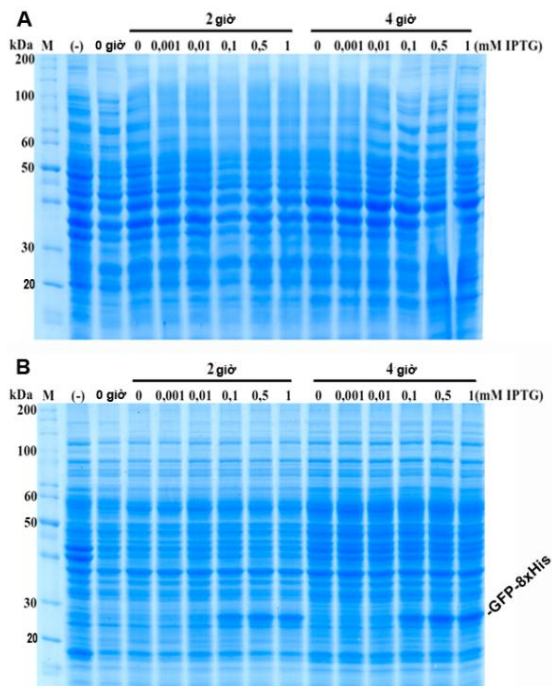


Hình 2. Kết quả phát huỳnh quang GFP trên đĩa thạch chứa IPTG (A) và phân tích độ đậm bằng AlphaEase (Alpha Inotech) tại nồng độ 0,1 mM IPTG (B) của *B. subtilis* 1012 mang vector pHT1169, pHT1170, sử dụng chứng âm là pHT01.

Đánh giá ảnh hưởng của 8xHis-tag trong môi trường lỏng sử dụng SDS-PAGE

Hai chủng *B. subtilis* 1012/pHT1169 và *B. subtilis* 1012/pHT1170 được nuôi cấy cảm ứng cùng 1 điều kiện như đã mô tả ở phần Vật liệu phương pháp. Mẫu được thu ở các thời điểm 0, 2, 4 giờ sau đó ly tâm thu sinh khối, phá mẫu và tiến hành điện di SDS-PAGE. GFP có kích thước tương đương là 27 kDa, gần vạch 30 kDa của thang chuẩn. Kết quả biểu hiện của GFP dung hợp với His-tag ở đầu N và C được thể hiện ở Hình 3. So sánh với chứng âm pHT01, chủng *B. subtilis*/pHT1170 (Hình 3B) cho khả năng biểu hiện GFP vượt mức ở những nồng độ IPTG cao

(0,1, 0,5 và 1 mM) và tăng dần theo thời gian cảm ứng. Tuy nhiên, vạch protein mục tiêu này lại rất khó nhận thấy đối với chủng *B. subtilis*/pHT1169 (Hình 3B). Như vậy, mức độ biểu hiện của GFP được dung hợp 8xHis-tag ở đầu N (pHT1169) giảm hơn rất nhiều so với dạng dung hợp ở đầu C (pHT1170). Điều này hoàn toàn trùng khớp với thí nghiệm khảo sát hoạt tính trên đĩa thạch. Sự ảnh hưởng này sẽ được kiểm chứng một lần nữa bằng phương pháp khảo sát cường độ phát huỳnh quang trên đĩa 384 giếng.



Hình 3. Kết quả khảo sát biểu hiện của GFP bằng phương pháp điện di SDS-PAGE 2 chủng *B. subtilis*/pHT1169 (A) và *B. subtilis*/pHT1170 (B). M, Thang protein; (-), pHT01. Mẫu thu ở 0, 2, 4 giờ sau khi cảm ứng với IPTG ở các 6 nồng độ khác nhau.

Đánh giá ảnh hưởng của 8xHis-tag trong môi trường lỏng sử dụng phương pháp đo hoạt tính trên đĩa 384 giếng

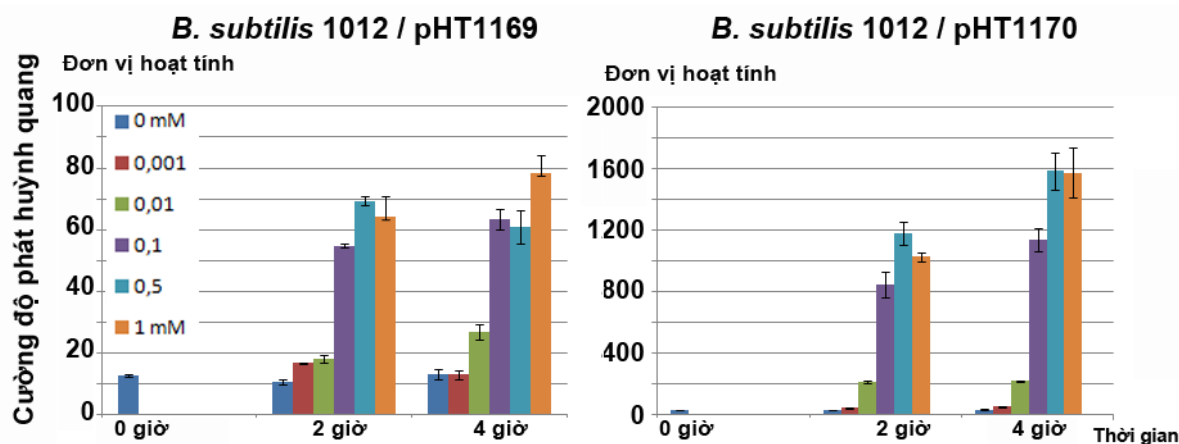
Phương pháp đo cường độ huỳnh quang có độ chính xác cao hơn 2 phương pháp trên. Nồng độ GFP càng cao thì giá trị đo huỳnh quang càng lớn và ngược lại, qua đó có thể đánh giá mức độ biểu hiện của GFP nhằm đưa ra được các thông số khách quan về ảnh hưởng của đuôi dung hợp 8xHis-tag. Số liệu được xử lý và trình bày dưới dạng đồ thị Hình 4. So sánh cường độ phát huỳnh quang của 2 chủng mang plasmid cần khảo sát, chúng tôi nhận thấy pHT1170 (~1600) cho khả năng biểu hiện GFP cao gấp 20 lần so với pHT1169 (~80). Trong đó, pHT1170 cho khả

năng biểu hiện tăng dần theo nồng độ IPTG và thời gian cảm ứng, đạt cực đại tại 0,5 mM IPTG sau 4 giờ cảm ứng. Đối với pHT1169, mức độ biểu hiện khá thấp dẫn đến sự chênh lệch giữa các nghiệm thức là không đáng kể. Kết quả này một lần nữa khẳng định việc His-tag dung hợp với protein GFP tại đầu N đã ảnh hưởng đến sự biểu hiện của protein này trong *B. subtilis*. Trong khi, His-tag ở đầu C cho mức độ biểu hiện khá tốt, cao gấp nhiều lần so với trường hợp còn lại.

Thảo luận

Để có thể phiên mã, RNA polymerase sẽ phải bám vào promoter và trượt, việc xuất hiện một đoạn gen *8xHis* nằm trước gen mục tiêu có khả năng sẽ ảnh hưởng đến quá trình phiên mã. Xét ở mức độ dịch mã, để có thể tổng hợp đuôi His-tag, tế bào phải huy động cùng lúc nhiều histidine, điều này sẽ gây một sự ùn tắc, làm chậm quá trình dịch mã nếu như tình trạng thiếu hụt t-RNA mang histidine diễn ra. Hoặc có khả năng, đầu N của GFP có vai trò quan trọng trong việc biểu hiện cũng như quyết định hoạt tính sau khi dịch mã, đuôi poly-histidine xuất hiện ở đầu N sẽ ảnh hưởng đến quá trình gấp cuộn, làm giảm hoạt tính của protein này [6].

Trong một nghiên cứu khác (kết quả chưa công bố), nhóm chúng tôi cũng đã khảo sát ảnh hưởng của His-tag lên sự biểu hiện của β -galactosidase (BgaB), khả năng biểu hiện của BgaB khi dung hợp với His-tag ở đầu N giảm hơn $\frac{3}{4}$ so với đầu C. Những kết quả có được hoàn toàn phù hợp giữa hai nghiên cứu, việc dung hợp His-tag vào đầu N đã ảnh hưởng rất lớn đến sự biểu hiện của 2 protein chỉ thị GFP và BgaB. Nhưng đây không phải là thông tin chung mà tùy thuộc vào protein mục tiêu.



Hình 4. Kết quả khảo sát hoạt tính GFP *B. subtilis* 1012/ pHT1169 (8xHis-GFP), *B. subtilis* 1012/ pHT1170 (GFP-8xHis).

KẾT LUẬN

Từ tất cả các kết quả đạt được, chúng tôi có những nhận xét như sau: khả năng biểu hiện GFP của plasmid pHT1169 giảm mạnh khi chèn thêm gen 8xHis vào trước gen *gfp*; trong khi đó, đối với plasmid pHT 1170 (cũng chứa promoter *Pgrac100*, đuôi His và gen *gfp*), nhưng lúc này gen 8xHis nằm sau gen mục tiêu thì khả năng biểu hiện GFP cao hơn gấp nhiều lần. Điều này

cho thấy vị trí dung hợp của His-tag ở đầu N đã làm giảm biểu hiện so với đầu C với chỉ thị là GFP. Đây cũng sẽ là một thông tin quan trọng trong chiến lược sử dụng pHT253 và pHT254.

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.

Investigating the expression of GFP fused with HIS-TAG at N- or C-terminus using plasmid pHT253 and pHT254 in *Bacillus subtilis*

- Nguyen Hoai Nam
- Phan Thi Phuong Trang
- Tran Linh Thuoc
- Nguyen Duc Hoang
University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

pHT253 and pHT254 belong to the plasmid system carrying Pgrac100, a strong promoter, which were commercialized in the global market in 2012 have pushed forward

the use of Bacillus subtilis as host for the production of recombinant proteins. Along with strong promoter Pgrac100, these two plasmids were added His-tag to before and

after MCS (Multi Cloning Site) in pHT253 (Pgrac100-8xHis-MCS) and pHT254 (Pgrac100- MCS-8xHis), respectively, to facilitate purification steps. Depending on the target protein, the user selects appropriate effective strategy of fusing His-tag, i.e. either into the N- or the C-terminal of protein. In this study, the GFP gene was used as an

indicator gene to investigate the influence of the His-tag position on the protein expression in *B. subtilis*. Our results showed that the expression of GFP in *B. subtilis* significantly was reduced in the fusion form with His-tag at the N-terminal. This would be important information for the selection of suitable vectors.

Key words: *Bacillus subtilis*, His-tag, GFP, Pgrac100, pHT253, pHT254.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. T.T.P. Phan, H.D. Nguyen, W. Schumann, Development of a strong intracellular expression system for *Bacillus subtilis* by optimizing promoter elements. *Journal of biotechnology*, 157, 1, 167-172 (2012).
- [2]. H.D Nguyen, T.T.P. Phan, W. Schumann, Expression vectors for the rapid purification of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Current microbiology*, 55, 2, 89-93, (2007).
- [3]. S.L. Wong, Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 6, 5, 517-522 (1995).
- [4]. *Bacillus subtilis* Pgrac100 Expression Vectors: http://www.mobitec.com/cms/products/bio/04_vector_sys/b_subtilis_pgrac100.html
- [5]. E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Döbeli, R. Gentz, D. Stüber, Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Nature Biotechnology* 6, 11, 1321-325, (1988).
- [6]. P. Ledent, C. Duez, M. Vanhove, A. Lejeune, E. Fonzé, P. Charlier, F. Rhazi-Filali, I. Thamm, G. Guillaume, B. Samyn, B. Devreese, J. Beeumen, J. Lamotte-Brasseur, J.M. Frère, Unexpected influence of a C-terminal-fused his-tag on the processing of an enzyme and on the kinetic and folding parameters. *FEBS letters*, 413, 2, 194-6(1997)
- [7]. 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, New York, N.Y.*, 273 ,5280, 1392-1395 (1996).