

# TẠO DÒNG TẾ BÀO NẤM MEN *Saccharomyces cerevisiae* BIỂU HIỆN PROTEIN PHÁT HUỖNH QUANG GFP (GREEN FLUORESCENT PROTEIN) TRÊN BỀ MẶT TẾ BÀO

Nguyễn Thanh Thùy Nhiên, Đặng Thị Phương Thảo, Trần Linh Thuớc

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 10 tháng 10 năm 2003)

**TÓM TẮT:** GFP (Green Fluorescent Protein) là một protein phát huỳnh quang từ sữa *Aequorea victoria*. Sự phát quang của GFP được thực hiện thông qua cơ chế tiếp nhận năng lượng từ một protein khác và không cần sự có mặt của bất kỳ cofactor hay enzyme nào. GFP được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu như y học, công nghệ sinh học, sinh học tế bào... Trong nghiên cứu này, chúng tôi dùng kỹ thuật tái tổ hợp gen để biểu hiện gfp trên bề mặt tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Gen gfp được gắn trên vector biểu hiện pICAS1 ở vị trí sau promoter GAPDH, trình tự tiết (secretion signal sequence) và trước gen mã hoá một phần đầu 3' của  $\alpha$ -agglutinin. Sự hiện diện của GFP trên bề mặt tế bào của dòng nấm men tái tổ hợp *Saccharomyces cerevisiae* được chứng minh bằng kỹ thuật kính hiển vi huỳnh quang. Bằng cách kết nối đồng khung giữa một gen mục tiêu và gen mã hoá cho GFP, hệ thống biểu hiện GFP trên bề mặt tế bào nấm men này có thể được sử dụng làm hệ thống chỉ thị cho sự biểu hiện của gen mục tiêu ngoại lai trên bề mặt tế bào nấm men.

## I. Mở đầu

Các thành phần trên bề mặt tế bào, đặc biệt là các protein rất quan trọng đối với sự sống của tế bào thông qua sự tương tác với môi trường, thể hiện đặc điểm và thực hiện chức năng của hệ thống sống. Trong những năm gần đây, một hướng nghiên cứu mới của công nghệ sinh học đang rất được quan tâm là công nghệ bề mặt tế bào (cell surface engineering). Đây là một công nghệ mới nhằm mục đích biểu hiện các gen ngoại lai, tác động và bổ sung protein chức năng trên bề mặt tế bào chủ từ đó mở ra nhiều triển vọng ứng dụng các gen đã được đồng hóa trong nhiều lĩnh vực khác nhau như liên kết giữa các tế bào, nhận diện phân tử, sản xuất vắc xin, thay đổi chức năng tế bào, tạo biosensor, trong xử lý môi trường, ...[1].

Khi ứng dụng hệ thống biểu hiện bề mặt tế bào vào lĩnh vực thực phẩm, dược phẩm, yêu cầu đặt ra là phải đảm bảo an toàn cho người sử dụng. Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* là đối tượng vi sinh vật thích hợp cho mục đích này nhờ tính an toàn của loài nấm men này. Bên cạnh đó, do là tế bào nhân thật (eukaryote), có khả năng biến đổi sau dịch mã và glycosyl hóa các protein ngoại lai nên nấm men cũng là tế bào chủ thích hợp cho công nghệ bề mặt tế bào đối với các gen ngoại lai có nguồn gốc tế bào nhân thật. Vì vậy, nấm men *Saccharomyces cerevisiae* là một đối tượng rất thích hợp cho sự phát triển hệ thống biểu hiện protein chức năng trên bề mặt tế bào[1].

GFP (Green Fluorescent Protein) là một protein phát huỳnh quang từ sữa *Aequorea victoria*. Sự phát quang của GFP được thực hiện thông qua cơ chế tiếp nhận năng lượng từ một protein khác và không cần sự có mặt của bất kỳ cofactor hay enzyme nào. Với đặc tính

phát quang sinh học, GFP ngày càng được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu như y học, công nghệ sinh học, sinh học tế bào... [2].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi dùng kỹ thuật tái tổ hợp gen để biểu hiện GFP trên bề mặt tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* nhằm mục đích xây dựng một hệ thống chỉ thị (reporter system) cho chọn lọc dòng tế bào đã được biến đổi protein bề mặt bằng kỹ thuật gen, tạo một công cụ hữu hiệu hỗ trợ cho sự phát triển của công nghệ bề mặt tế bào nấm men.

## II. Vật liệu và phương pháp

**Chủng vi sinh vật.** Chủng *Escherichia coli* DH 5 $\alpha$  [F<sup>-</sup> endA1 hsdR17 (r<sub>k</sub>/m<sub>k</sub>) supE44 thi  $\lambda$  recA1 gyrA96  $\Delta$  lac U 169 ( $\phi$  80 lacZ  $\Delta$  M15)] được dùng trong biến nạp nhằm khuếch đại số lượng bản sao các vector. Chủng *S. cerevisiae* MT8-1 (MAT $\alpha$  ade his leu2 trp1 ura3) được dùng làm tế bào chủ, biểu hiện gen *gfp*.

**Môi trường và hóa chất.** Môi trường LB, Luria-Bertani (trypton pepton 1%, Yeast extract 0,5%, NaCl 0,5%) được sử dụng trong nuôi cấy và biến nạp ở *E. coli* [3]. Môi trường SD-trp (Leucine 30mg/l, Histidine 20mg/l, Adenine 20mg/l, Uracil 20mg/l, Yeast Nitrogen Base 6,7g/l, glucose 20g/l) là môi trường tổng hợp thiếu tryptophan dùng trong chọn lọc và nuôi cấy thể nấm men biến nạp. Môi trường YPD, Yeast Pepton Dextrose (Yeast extract 1%, Bacto pepton 2%, glucose 2%) được dùng trong nuôi cấy tế bào chủ *S. cerevisiae* [3].

Vector biểu hiện pICAS1 (Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Phân Tử): kích thước 6457 bp, mang gen kháng Amp và điểm khởi đầu sao mã ColE1 ori cho phép sao chép và chọn lọc plasmid ở *E. coli*, mang gen mã hóa cho khả năng sinh tổng hợp tryptophan là gen chọn lọc trong nấm men, mang phần gen mã hóa cho trình tự peptid đầu C của protein  $\alpha$ -agglutinin (là một protein có trong vách tế bào nấm men giữ vai trò quan trọng trong sự biểu hiện protein ngoại lai trên bề mặt tế bào nấm men), có vùng multi cloning site với một vị trí cắt duy nhất của enzym *SacII*. Các gen thể hiện trong pICAS1 được điều khiển bởi promoter GAPDH là một promoter cảm ứng với chất cảm ứng là glucose, vùng sss (secretion signal sequence) có chức năng định vị protein trong tế bào.

Vector pGFP<sub>UV</sub> (Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Phân Tử): kích thước 3347 bp, mang gen kháng Amp và gen *gfp* mã hoá cho protein phát huỳnh quang GFP.

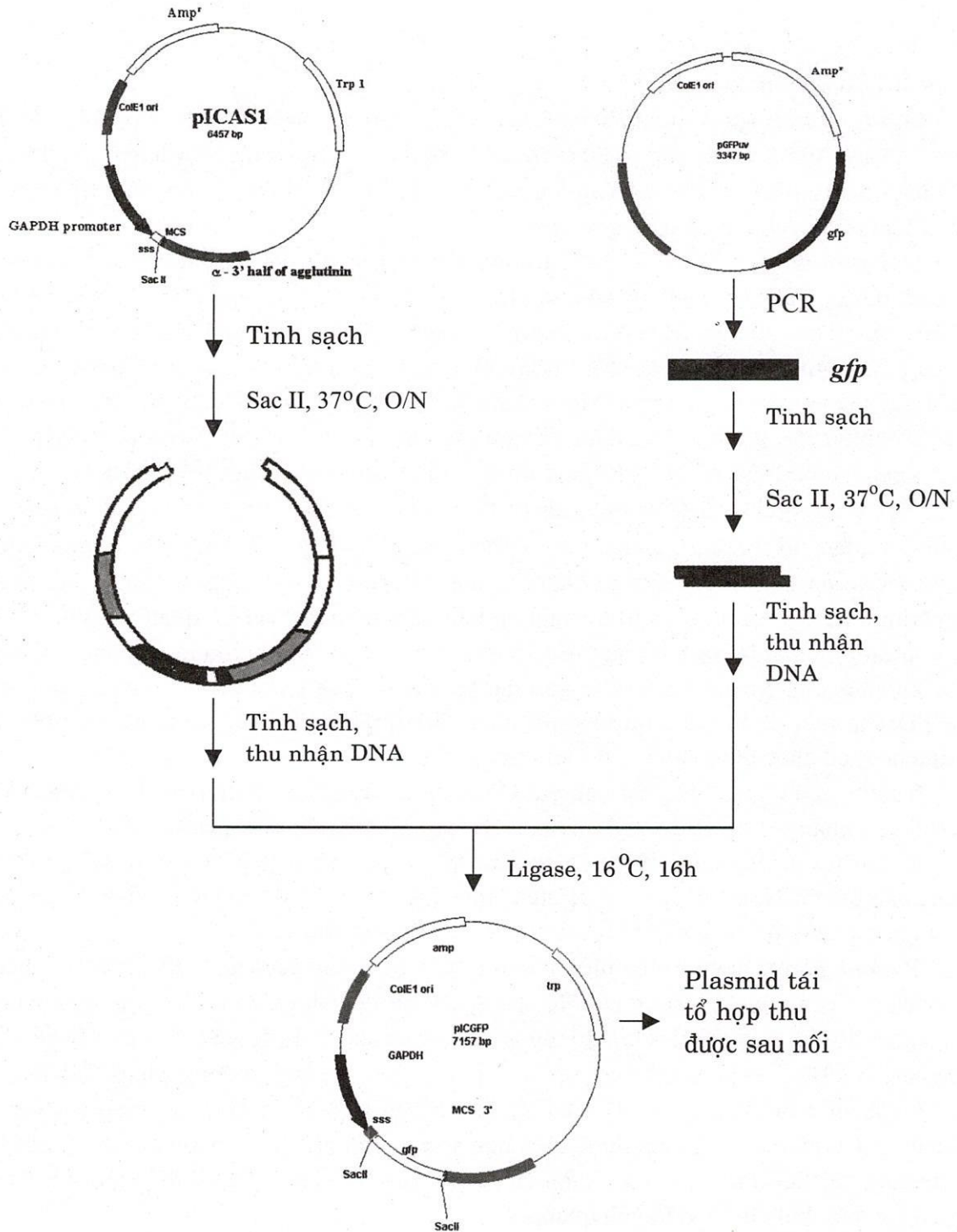
Các trình tự oligonucleotide dùng làm môi trong phản ứng khuếch đại gen *gfp* được cung cấp bởi GENSET Singapore Biotechnology Pte Ltd. Các hóa chất sử dụng cho kỹ thuật tái tổ hợp gen được cung cấp bởi Amersham Pharmacia Biotech.

**Phương pháp.** Vector biểu hiện *gfp* trên bề mặt tế bào nấm men được thiết kế bằng cách khuếch đại gen *gfp* từ plasmid pGFP<sub>UV</sub> bằng cặp mồi đặc hiệu có trình tự cắt chuyên biệt cho enzyme cắt giới hạn *SacII*. Gen *gfp* được chèn vào plasmid pICAS1 ở vị trí cắt giới hạn của enzyme *SacII*. Các plasmid được biến nạp vào *E. coli* bằng phương pháp Calcium – lạnh [3,5]. Plasmid được tách chiết và tinh sạch từ *E. coli* bằng phương pháp SDS-kiểm [5]. Vector pICGFP biểu hiện *gfp* được biến nạp vào tế bào nấm men bằng phương pháp Lithium – acetate cải tiến [4,6]. Sự hiện diện của GFP trên bề mặt tế bào được kiểm tra bằng cách quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang.

### III. Kết quả và thảo luận

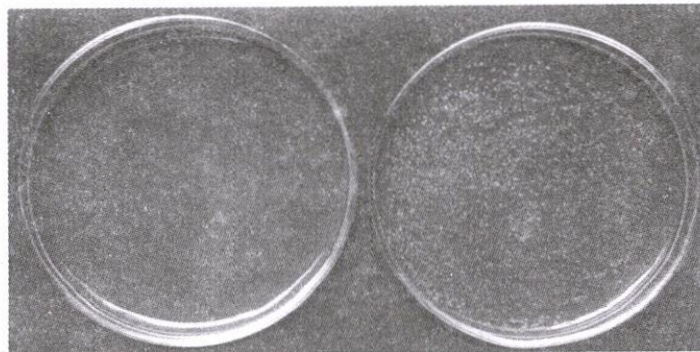
#### III.1. Thiết kế vector pICGFP biểu hiện GFP trên bề mặt tế bào nấm men

Quy trình thiết kế vector biểu hiện GFP trên bề mặt tế bào nấm men được minh họa trên Hình 1. Trước tiên tiến hành cắt vector pICAS1 và sản phẩm khuếch đại gen *gfp* bằng enzyme cắt giới hạn *SacII*, tinh sạch, thực hiện phản ứng nối để tạo các plasmid tái tổ hợp.



Hình 1: Quy trình thiết kế vector biểu hiện GFP trên bề mặt tế bào nấm men

Các plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào *E.coli* DH5 $\alpha$ . Dòng mang plasmid được tuyển chọn bằng môi trường LB chứa Ampiciline (50 $\mu$ g/ml). Các tế bào *E.coli* DH5 $\alpha$  mọc được trên môi trường này là các thể biến nạp mang vector (Hình 2).

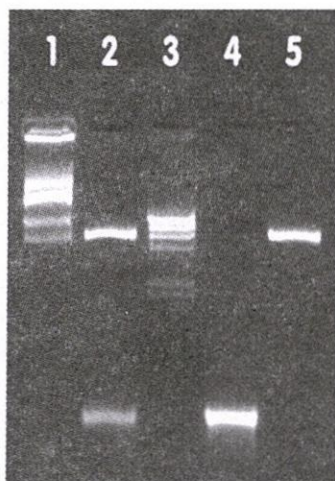


1

2

**Hình 2:** Biến nạp sản phẩm nối vào *E.coli* DH5 $\alpha$   
1: Đĩa đối chứng  
2: Đĩa biến nạp

Từ các thể biến nạp chọn được, chúng tôi tiến hành tách chiết plasmid và kiểm tra sự hiện diện của *gfp* bằng phản ứng cắt giới hạn với enzyme *SacII* (Hình 3).

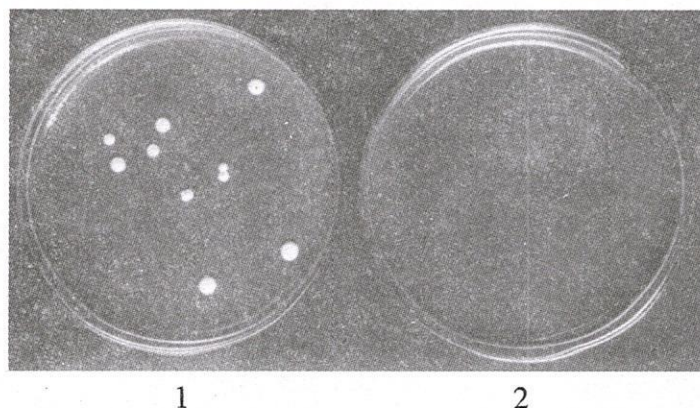


**Hình 3:** Kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng enzyme cắt giới hạn *SacII*  
1: plasmid pICGFP (vector tái tổ hợp)  
2: vector tái tổ hợp (pICGFP) được cắt bởi *SacII*  
3: thang  $\lambda$ -HindIII  
4: gen *gfp* được cắt bởi *SacII*  
5: plasmid pICAS1 được cắt bởi *SacII*

Kết quả kiểm tra cho phép chọn được dòng *E.coli* DH5 $\alpha$  chứa plasmid tái tổ hợp, plasmid này khi bị cắt bởi *SacII* cho hai đoạn gen có kích thước tương ứng với pICAS1 và gen *gfp*. Chúng tôi ký hiệu plasmid tái tổ hợp thu được từ dòng này là pICGFP.

### III.2. Tạo dòng tế bào *S. cerevisiae* MT8-1 biểu hiện GFP trên bề mặt tế bào

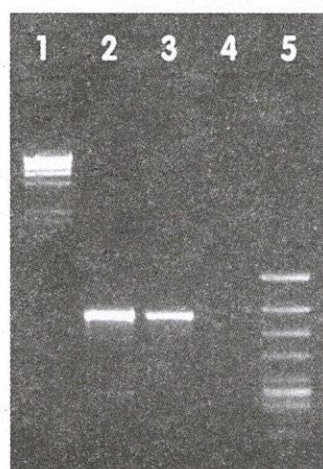
Plasmid tái tổ hợp pICGFP được biến nạp vào nấm men *S.cerevisiae* bằng phương pháp Lithium – acetate cải tiến. Chúng tôi tiến hành chọn lọc thể biến bằng cách trải huyền phù sau biến nạp lên môi trường SD-trp. MT8-1 là chủng đột biến khuyết dưỡng tryptophan nên chủng này sẽ không mọc được trên môi trường SD-trp. Ngược lại, các thể biến nạp mang vector tái tổ hợp có khả năng tăng trưởng trong môi trường này. Kết quả biến nạp thể hiện ở Hình 4



**Hình 4 :** Biến nạp vector tái tổ hợp pICGFP vào tế bào nấm men *S. cerevisiae*  
 1: Đĩa đối chứng  
 2: Đĩa biến nạp

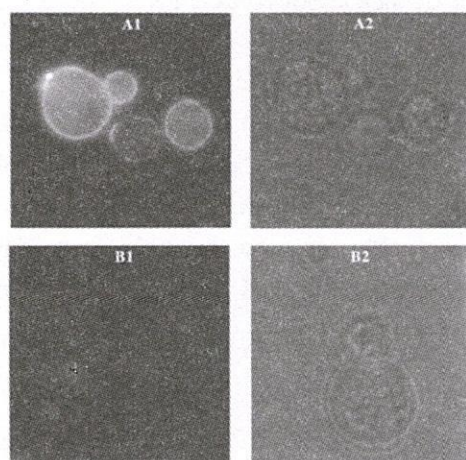
### III.3. Kiểm tra sự biểu hiện của gen *gfp* trên bề mặt tế bào nấm men

Để kiểm chứng sự biểu hiện của protein GFP trên bề mặt tế bào nấm men, trước hết chúng tôi tiến hành kiểm tra sự hiện diện của gen *gfp* trong dòng nấm men biến nạp. DNA từ dòng biến nạp được ly trích. Sự hiện diện của gen *gfp* được kiểm chứng thông qua phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu. Kết quả PCR cho thấy khi thực hiện phản ứng PCR trên khuôn là DNA bộ gen của dòng nấm men biến nạp, sản phẩm khuếch đại có chiều dài tương ứng với đoạn gen *gfp* (Hình 5). Như vậy, dòng nấm men tái tổ hợp mang gen *gfp*.



**Hình 5 :** Kết quả kiểm tra DNA plasmid tách từ dòng nấm men tái tổ hợp  
 1: Thang  $\lambda$ -Hind III  
 2: Sản phẩm khuếch đại từ khuôn DNA của dòng nấm men tái tổ hợp  
 3: Sản phẩm khuếch đại từ khuôn DNA plasmid pICGFP  
 4: Sản phẩm khuếch đại từ khuôn DNA của MT8-1  
 5: Thang  $\Phi$ X-174-RF HincII

Sự biểu hiện của *gfp* trên bề mặt tế bào nấm men được kiểm chứng bằng cách quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang với bước sóng kích thích là 395nm (Hình 6).



**Hình 6:** Kiểm tra sự biểu hiện GFP trên bề mặt tế bào nấm men tái tổ hợp  
 A1: pICGFP/MT8-1 dưới ánh sáng tử ngoại 395nm  
 A2: pICGFP/MT8-1 dưới ánh sáng trắng  
 B1: MT8-1 dưới ánh sáng tử ngoại 395nm  
 B2: MT8-1 dưới ánh sáng trắng

Dòng nấm men tái tổ hợp phát huỳnh quang xung quanh bề mặt tế bào khi được kích thích bằng tia UV ở 395nm. Trong điều kiện không được kích thích, tế bào nấm men biến nạp không phát sáng. Ngược lại ở lô đối chứng, chủng MT8-1 không phát sáng kể cả khi được kích thích dưới ánh sáng tử ngoại. Như vậy, chúng tôi đã thành công trong việc tạo dòng nấm men *S. cerevisiae* pICGFP/MT8-1 biểu hiện protein phát huỳnh quang GFP trên bề mặt tế bào.

#### IV. Kết luận

Sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử, kỹ thuật gen, chúng tôi đã thành công trong việc tạo dòng tế bào nấm men *S. cerevisiae* pICGFP/MT8-1 biểu hiện protein phát huỳnh quang GFP trên bề mặt.

Hệ thống biểu hiện này có thể được dùng làm hệ thống chỉ thị (reporter system) cho sự biểu hiện của protein ngoại lai trên bề mặt tế bào nấm men. Kết quả nghiên cứu là cơ sở cho việc phát triển ứng dụng các hệ thống biểu hiện bề mặt tế bào nấm men ở Việt Nam.

### ESTABLISHING A YEAST *Saccharomyces cerevisiae* CLONE EXPRESSING GFP (GREEN FLUORESCENT PROTEIN) ON THE CELL SURFACE

Nguyen Thanh Thuy Nhen, Dang Thi Phuong Thao, Tran Linh Thuoc

**ABSTRACT:** GFP is a fluorescent protein from jellyfish *Aequorea victoria*. The luminescence of GFP is occurred based on an energy transfer from another protein without requirement of the role of any cofactor or enzyme. GFP has been used in many areas such as medicine, biotechnology, cell biology, ... In this research, by using DNA recombinant technology, we succeeded in expressing *gfp* gene on cell surface of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gfp* gene is cloned onto the expression vector pICAS1 downstream of the GAPDH promoter, the secretion signal sequence and upstream of 3' half of  $\alpha$ -agglutinin gene. The presence of GFP on the yeast recombinant clone *Saccharomyces cerevisiae* was proved by fluorescent microscopic observation. By fusing in frame of a target gene with the *gfp* gene, the GFP-displaying system on yeast cell surface can be used as a reporter system for the expression of any foreign genes on the yeast cell surface.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] T. Murai, M. Ueda, A. Tanaka, Practical Application of Microbial Cell Surface Engineering: Review, *Recent Res. Devel. Microbiology*, 3, (1999): 7-22.
- [2] T. Misteli, D.L. Spector, Application of the Green Fluorescent Protein in Cell biology and Biotechnology, p 246-p 248, *Nature Biotechnology*, Vol. 15, October 1997.
- [3] M.T. Dawson, R. Powell, F. Gannon, *Gene Technology*, p 32-38, 58-62, 66-67, 1996, Information Press Ltd, Oxford, UK.

- [4] B. R. Glick, J.J. Pasternak, *Molecular Biotechnology Principles and applications of Recombinant DNA* (second edition), 1998, ASM PRESS Washington, D.C.
- [5] Sambrook, Fritsch, Maniatis, *Molecular Cloning: A laboratory manual*, p 1.25 -1.44 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [6] Fredrick M. A, Roger. B, Robert E. K, *Current Protocols in Molecular Biology*, p.13.7.1, 1994, John Wiley & Sons, Inc.