

THIẾT KẾ PLASMID BIỂU HIỆN PROTEIN *EYFP* TRONG TẾ BÀO CHẤT NẤM MEN NHỜ SỰ CẢM ỨNG BẰNG GLUCOSE

Nguyễn Đức Hoàng¹, Phan Thị Phương Trang¹, Trần Linh Thuớc¹,
Mitsuyoshi Ueda² và Atsuo Tanaka²

¹ Trường ĐH Khoa học Tự nhiên - ĐH Quốc Gia TP.HCM - Việt Nam

² Phòng thí nghiệm Hóa sinh ứng dụng - Trường Đại học Kyoto - Nhật Bản

(Bài nhận ngày 27 tháng 3 năm 2002, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 22 tháng 4 năm 2002)

TÓM TẮT: Đoạn DNA của promoter *GAPDH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) có khả năng được cảm ứng bằng glucose và đoạn gen mã hóa cho protein phát huỳnh quang *EYFP* (Enhanced Cyan Fluorescent Protein) được dòng hóa vào plasmid *pRS406* có mang đoạn 2 μ m DNA của nấm men để tạo một vector biểu hiện đa bản sao trong tế bào nấm men. Vector được tạo thành cho phép *EYFP* biểu hiện trong tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* khi có sự hiện diện của glucose trong môi trường. Sự phát huỳnh quang của *EYFP* trong tế bào chất của tế bào nấm men được xác nhận bằng kính hiển vi huỳnh quang và bằng cách đo cường độ huỳnh quang trong phân đoạn tế bào chất của tế bào nấm men.

MỞ ĐẦU

Việc phát hiện cấu trúc hóa học của nhóm mang màu (chromophore) và thành công trong việc dòng hóa của GFP (Green Fluorescence Protein) đã cho phép tạo ra các dòng GFP đột biến có khả năng phát huỳnh quang ở các bước sóng khác nhau như GFP, YFP (Yellow Fluorescence Protein), CFP (Cyan Fluorescence Protein). Từ những thành công này các dạng đột biến của GFP được sử dụng mạnh mẽ làm gen chỉ thị trong các lĩnh vực sinh học tế bào, sinh học phát triển, sinh học môi trường [1].

Ưu điểm của GFP là protein này có thể phát sáng mà không cần cofactor do nhóm huỳnh quang (fluorophore) hình thành từ sự vòng hóa của khung peptide. Ưu điểm này giúp cho GFP có thể trở thành gen chỉ thị cho các protein ở nhiều vị trí khác nhau. Ngoài ra, nhiều kết quả nghiên cứu cho thấy protein chỉ thị này không làm thay đổi chức năng bình thường của protein cần khảo sát [1], [2].

Cho đến nay vài reporter dạng enzyme như β -galactosidase và luciferase đã được sử dụng làm chỉ thị để biểu hiện gen ở các sinh vật. Các chỉ thị dạng enzyme có nhiều thuận lợi trong nghiên cứu sự biểu hiện gen vì chúng có thể được định lượng sau khi phá vỡ tế bào. Tuy nhiên các marker này không thể dùng để theo dõi sự biểu hiện ở các nội quan trong tế bào trong điều kiện không phá vỡ tế bào và rất khó để sử dụng trong phân tích *in vivo* [3]. Để khắc phục những nhược điểm này, các GFP có thể được dùng làm marker cho sự biểu hiện gen, định vị protein, các phân tích sinh học và phân tử vì chúng có thể được quan sát ở tế bào nguyên vẹn. Ngoài ra, các dạng đột biến của GFP cũng đã được sử dụng làm marker rất thành công cho nhiều đối tượng sinh vật như procaryote, nấm men, thực vật và động vật [2].

Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* là mô hình sinh vật được ưa thích nhất được dùng trong các lĩnh vực công nghiệp và nghiên cứu sinh học cơ bản. Tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học phân tử, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh chúng tôi đã biểu hiện thành công GFP lên bề mặt nấm men để làm hệ thống gen chỉ thị trong các nghiên cứu sự biểu hiện các protein mục tiêu khó có thể định tính hoặc có thể phát hiện trên bề mặt tế bào. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành biểu hiện protein-EYFP (Enhance Yellow Fluorescence Protein) trong tế bào chất nấm men *Saccharomyces cerevisiae* bằng cách sử dụng một promoter được cảm ứng bằng glucose.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng giống vi sinh vật và điều kiện nuôi cấy.

Escherichia coli DH5 α [F^- , ϕ 80lacZ Δ M15, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(r_k^- , m_k^+), *phoA*, *supE44*, λ , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*] được nuôi cấy ở 37°C trong môi trường Luria-Bertani (LB) [1% tryptone (Difco, Mich., USA), 0,5% yeast extract (Difco) và 1% NaCl] có bổ sung 100 μ g/ml ampicillin khi cần, được sử dụng làm tế bào chủ để nhân bản plasmid. *Saccharomyces cerevisiae* MT8-1 (*MAT α* , *ade*, *his3*, *leu2*, *trp1*, *ura3*) được nuôi cấy ở 30°C trong môi trường YPD [1% yeast extract, 2% polypeptone (Difco), và 2% glucose] hoặc môi trường SD [0,67% yeast nitrogen base (YNB) (Difco), 2% glucose], được bổ sung các amino acid cần thiết. HEPES được thêm vào môi trường SD đạt 50mM để làm đệm cho môi trường trong thời gian nuôi cấy [4].

Cấu trúc plasmid.

Đoạn 2 μ m DNA có nguồn gốc từ nấm men (cho phép tạo nên một lượng lớn bản sao trong tế bào nấm men) của plasmid pWI3 [5] được cắt bằng *EcoRI* và chèn vào plasmid pRS406 [6] để được plasmid pR2 chứa đoạn 2 μ m DNA. Promoter GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) [7] có thể được cảm ứng bằng glucose được khuếch đại bằng PCR sử dụng pICAS1 [8] làm khuôn với cặp primer gồm 5'-GGATCCGGTACCG AGTCATCGAGTTTATCATTATCAATACTCGCCA-TTTC AAAGAATACG-3' để tạo vị trí cắt *KpnI* và 5'-CCCGGGCCGCGGCTCGAG-TATTTATGTGTGTTTATTCAA CTAAGTTCTTGG-3' để tạo vị trí cắt *XhoI*. Đoạn cắt bởi *KpnI/XhoI* được dòng hóa vào plasmid pR2 để tạo plasmid pR2G mang promoter GAPDH. Đoạn gen EYFP được khuếch đại bằng PCR sử dụng plasmid pEYFP (Clontech, Calif., USA) làm khuôn với cặp primer 5'-GGATCCCTCGAGCT-TAAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTG G-3' để tạo vị trí cắt cho *XhoI* và 3'-AAGCTTATCGATTTAGTCGACCTTGTA CAGCTCGTCCAT-GCCGAGAGTGATCCCG-5' để tạo stop codon và vị trí cắt cho *BanIII*. Đoạn cắt *XhoI/BanIII* được tạo dòng vào pR2G để tạo plasmid pR2GY mang EYFP.

Giải trình tự.

Các đoạn DNA, GAPDH và gen EYFP, sau khi được dòng hóa vào vector đã được kiểm chứng bằng cách đọc trình tự trên DNA sequencer hiệu 373, Applied Biosystem. Kết quả trình tự này được phân tích so sánh bằng chương trình GENETYX (Software Development Co., Ltd).

Các phương pháp khác.

Các phản ứng cắt nối DNA, điện di trên gel agarose và biến nạp vào chủng chủ *E. coli* được thực hiện theo Shambrook và Russel [9]. Biến nạp plasmid vào nấm men theo qui trình của Clontech [10].

Kỹ thuật kính hiển vi huỳnh quang.

Kính hiển vi huỳnh quang (Olympus, Nhật Bản) được sử dụng để quan sát trực tiếp hoạt tính EYFP biểu hiện trong tế bào nấm men *S. cerevisiae*. Chủng nấm men MT8-1 được sử dụng làm tế bào chủ để biểu hiện plasmid pR2GY. Dòng nấm men MT8-1 mang plasmid pR2GY (MT8-1/pR2GY) được nuôi cấy lắc 16-24 giờ ở 30°C trong 10ml môi trường SD có bổ sung 0,002% histidine, 0,01% leucine, 0,002% tryptophane và 0,002% adenine để ức chế sự tạo thành sắc tố không bào đỏ vì sự đột biến của *ade2*. Để quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang, nấm men đã nuôi cấy được ly tâm để thu nhận tế bào. Dịch huyền phù tế bào nấm men được đặt lên phiến kính và lá kính không phát huỳnh quang. Ánh sáng huỳnh quang của EYFP được phát hiện qua các bộ lọc kích thích 495nm và phát sáng 535nm (Omega optical).

Thu nhận tế bào chất.

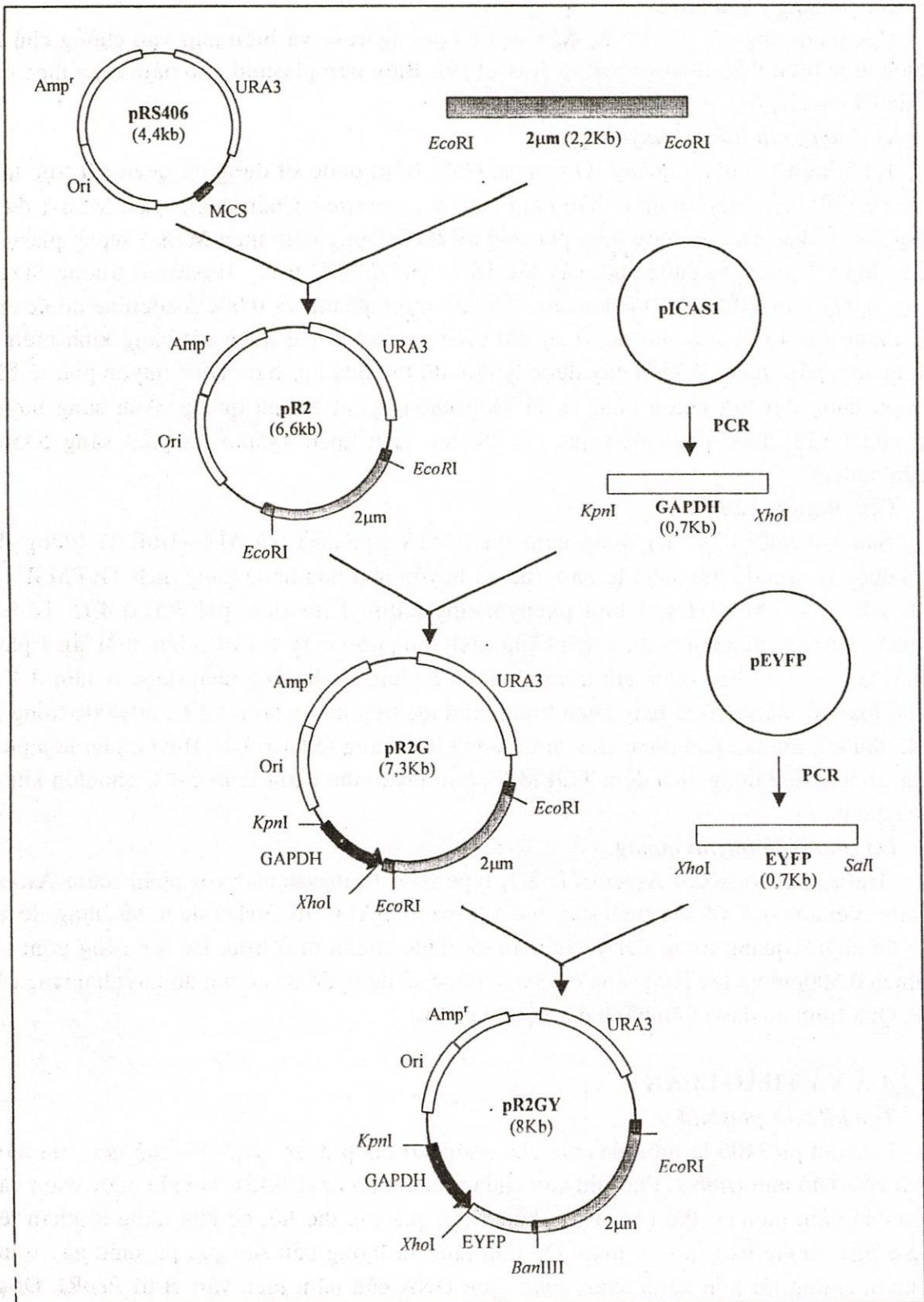
Sau khi nuôi cấy, hai dòng nấm men MT8-1/pR2GY và MT8-1/pR2G (dòng đối chứng) được ly tâm để thu nhận tế bào, rửa và huyền phù hóa bằng dung dịch TE/PMSF (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 7,5) ở 4°C. Tế bào được phá vỡ bằng các viên bi thủy tinh bằng cách rung trên máy vortex 5 lần, mỗi lần 1 phút. Sau mỗi lần rung, tế bào được giữ trong đá lạnh 2 phút. Dịch đồng nhất được ly tâm ở 4°C, 700g để loại bỏ mảnh vỡ tế bào. Dịch trong lại được tiếp tục ly tâm ở 4°C, 20,000g trong 20 phút để thu kết tủa là phân đoạn chứa một lượng lớn màng tế bào chất. Huyền phù hóa phần kết tủa trong 2,5ml dung dịch đệm TE/PMSF. Sản phẩm được giữ lạnh ở 4°C cho đến khi đo huỳnh quang [11].

Đo cường độ huỳnh quang.

Thiết bị Fluoroskan Ascent FL 2.2, type 347, (Labsystems) với phần mềm Ascent Software Version 2.4 và đĩa nuôi cấy mô (24-wells FALCON 3047) được sử dụng để đo cường độ huỳnh quang trong (OD) các mẫu đã được chuẩn bị ở trên. Bộ lọc sáng gồm lọc kích thích ở 500nm và lọc phát sáng ở 538nm được sử dụng để đo cường độ huỳnh quang của EYFP. Quá trình đo được tiến hành ở nhiệt độ phòng.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**Tạo pR2GY plasmid.**

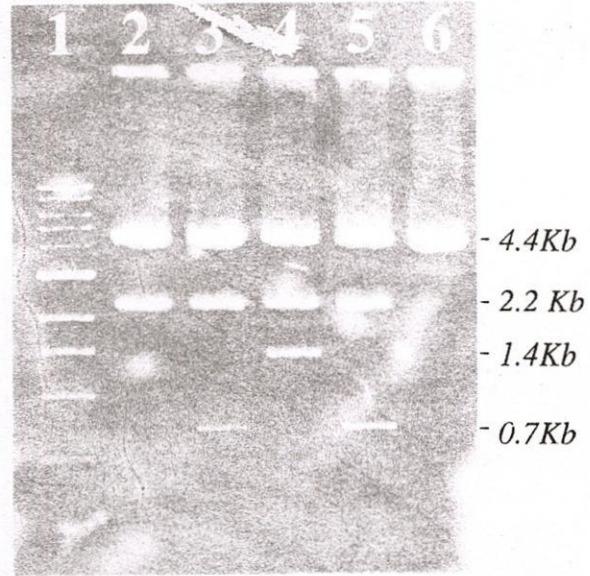
Plasmid pRS406 là một plasmid cho phép sát nhập đoạn DNA vào bộ gen của nấm men và có sơ đồ như Hình 1. Plasmid này chứa uracil marker (*URA3*), sau khi được chèn vào bộ gen của nấm men có thể tồn tại rất bền vững qua các thế hệ, có khả năng tự nhân lên nhưng với số lượng bản sao rất thấp. Để làm tăng số lượng bản sao của plasmid này trong nấm men, chúng tôi tiến hành chèn đoạn 2µm DNA của nấm men vào vị trí *EcoRI*. Đoạn 2µm này sẽ giúp plasmid tạo ra một số lượng lớn bản sao trong tế bào nấm men, khá bền vững qua các thế hệ, giúp cho sự biểu hiện của gen ở mức cao hơn để có thể xác định sự biểu hiện dễ dàng hơn. Plasmid pRS406 mang đoạn 2µm DNA là pR2 (Hình 1), được kiểm tra bằng cách sử dụng enzyme cắt hạn chế *EcoRI* (Hình 2, Giếng 2).



Hình 1. Sơ đồ cấu trúc của plasmid pR2GY

Tiếp theo đó, chúng tôi tiến hành khuếch đại đoạn GAPDH promoter bằng PCR và dòng hóa promoter này vào plasmid pBluescript KS(+/-) tại vị trí *EcoRV*, kiểm tra đoạn này bằng cách giải trình tự, so sánh độ tương đồng của chúng với trình tự gốc. Đoạn GAPDH này được dòng hóa vào plasmid pR2 tại vị trí cắt bởi enzym *KpnI* và *XhoI*. Hoạt tính của promoter GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) được cảm ứng bằng glucose. Plasmid tạo thành có tên pR2G (Hình 1) được phân tích bằng cách sử dụng enzyme *KpnI* và *EcoRI* (Hình 2, Giếng 3).

Hình 2. Bản đồ cắt hạn chế của các plasmid. Giếng 1, thang DNA chuẩn 1Kb (từ trên xuống 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1.5, 1 và 0.5Kb); Giếng 2, DNA của plasmid pR2 được cắt bằng *EcoRI*; Giếng 3, DNA của plasmid pR2G được cắt bằng *EcoRI* và *KpnI*; Giếng 4, DNA của plasmid pR2GY được cắt bằng *EcoRI* và *KpnI*; Giếng 5, DNA của plasmid pR2GY được cắt bằng *EcoRI*, *XhoI* và *KpnI*; Giếng 6, DNA của plasmid pRS406 được cắt bằng *EcoRI*.

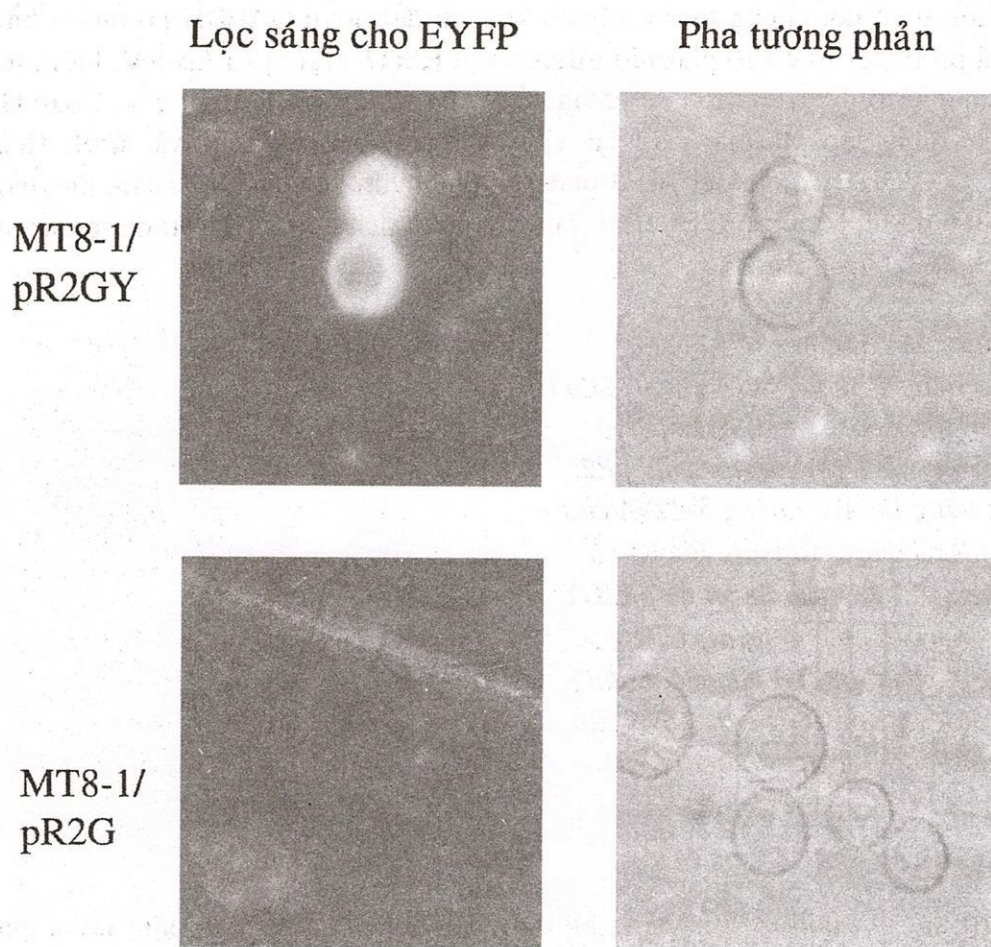


Để tạo plasmid có khả năng biểu hiện EYFP trong tế bào nấm men, gen EYFP đã được khuếch đại và dòng hóa vào pBluescript KS(+/-) tại vị trí *EcoRV*, kiểm tra gen này bằng cách giải trình tự, so sánh độ tương đồng của chúng với trình tự gốc. Đoạn EYFP này được tạo dòng vào plasmid pR2G tại vị trí cắt của *XhoI* và *SallI*. Plasmid tạo thành có tên pR2GY (Hình 1) được kiểm tra bằng cách sử dụng enzyme cắt hạn chế (Hình 2, Giếng 4, 5). Sau đó chúng tôi tiến hành giải trình tự GAPDH và EYFP của plasmid này để kiểm chứng tính nguyên vẹn về trình tự base của các đoạn này. Như vậy sự biểu hiện của gen EYFP trong nấm men sẽ chịu sự kiểm soát của GAPDH promoter và được cảm ứng bằng glucose.

Ở nấm men, protein được tổng hợp tại tế bào chất và vị trí xuất hiện của chúng sau đó tùy thuộc vào trình tự acid amin của nó. Các protein có mang các trình tự tín hiệu sẽ hướng các protein đến nơi cần thiết, còn những protein không có trình tự tín hiệu này sẽ ở lại trong tế bào chất [12]. Với mục đích biểu hiện protein bên trong tế bào chất, chúng tôi thiết kế plasmid mà protein EYFP không chứa tín hiệu tiết (sorting signal).

Sự biểu hiện của EYFP

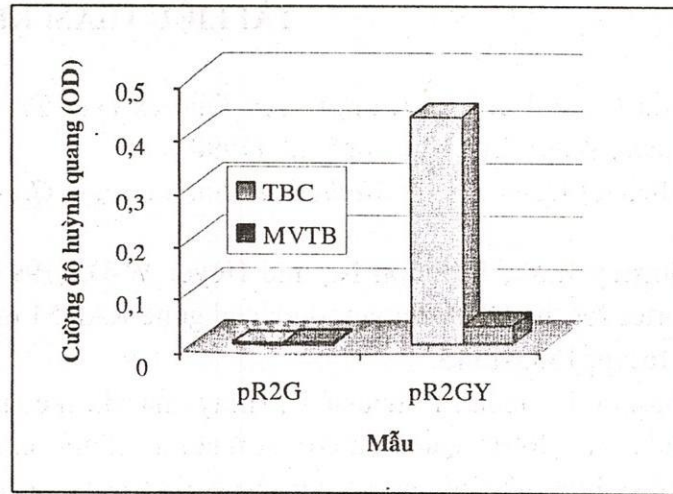
Plasmid pR2GY và pR2G (đối chứng âm) được biến nạp vào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* MT8-1 và được nuôi cấy trên môi trường SD có bổ sung các amino acid cần thiết. Các chủng biến nạp được quan sát và chụp hình dưới kính hiển vi huỳnh quang. Hình 3 cho thấy chủng nấm men có chứa plasmid pR2GY có khả năng biểu hiện EYFP trong tế bào dưới sự điều khiển của GAPDH promoter. Trong khi đó chủng nấm men chứa plasmid pR2G không biểu hiện EYFP.



Hình 3. Hình chụp qua kính hiển vi huỳnh quang của nấm men có chứa plasmid pR2G và pR2GY. Mẫu MT8-1/pR2GY, nấm men có chứa plasmid pR2GY; mẫu MT8-1/pR2G, nấm men có chứa plasmid pR2G (đối chứng âm). Lọc sáng cho EYFP, nấm men được chụp dưới kính hiển vi huỳnh quang qua các lọc sáng cho EYFP; pha tương phản, nấm men được chụp qua kính hiển vi dưới pha tương phản.

Bên cạnh việc kiểm tra sự biểu hiện của EYFP bằng cách quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang, chúng tôi tiến hành đo cường độ huỳnh quang của EYFP trong phân đoạn chứa tế bào chất và phân đoạn chứa vách màng tế bào bằng máy đo huỳnh quang. Ở mẫu pR2G đối chứng, không phát hiện được sự biểu hiện của EYFP, trong khi ở mẫu pR2GY cường độ huỳnh quang trong tế bào chất rất cao, hơn hẳn các mẫu còn lại. Qua thí nghiệm này có thể cho thấy EYFP được biểu hiện trong tế bào chất của nấm men (Hình 4).

Hình 4. Cường độ huỳnh quang của các phân đoạn trong các mẫu pR2G (đối chứng) và pR2GY. PR2G, là mẫu được chiết tách từ nấm men có mang plasmid pR2G; PR2GY là mẫu được chiết tách từ nấm men có mang plasmid pR2GY. TBC, là tế bào chất và các bào quan nhỏ; MVTB, là mảnh vỡ tế bào và màng tế bào chất.



Các kết quả trên cho phép kết luận rằng protein-EYFP đã biểu hiện thành công trong tế bào chất nấm men thông qua sự cảm ứng bằng glucose có sẵn trong môi trường nuôi cấy. Tính đơn giản trong việc phát hiện EYFP trong tế bào nấm men dưới kính hiển vi huỳnh quang cho phép mở ra nhiều triển vọng trong việc sử dụng EYFP làm chỉ thị để khảo sát sự biểu hiện một protein trong tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* và có thể sử dụng cho những hệ thống nghiên cứu khác.

CONSTRUCTION OF A PLASMID EXPRESSING *EYFP* IN THE YEAST CYTOPLASMIC FRACTION UNDER GLUCOSE INDUCTION

Nguyen Duc Hoang¹, Phan Thi Phuong Trang¹, Tran Linh Thuoc¹,
Mitsuyoshi Ueda², and Atsuo Tanaka²

¹ Faculty of Biology - University of Natural Sciences – VNU-HCM, Viet Nam

² Laboratory of Applied Biochemistry, Kyoto University, Japan.

ABSTRACT: The GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) promoter and the EYFP gene (Enhanced Cyan Fluorescence Protein) were cloned and introduced into the plasmid pRS406 containing the 2 μ m DNA of yeast genome to produce an expressing vector named as pR2GY which can be induced by glucose in the yeast cell. The constructed vector could express EYFP in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the medium containing glucose. The fluorescence of EYFP in the yeast was confirmed under fluorescence microscopic observation and by measuring the fluorescent intensity of the cytosol fraction of the yeast cells.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Martin C., and Steven Kain, *Green Fluorescence Protein: properties, applications, and protocols*, Wiley-Liss, Inc., pp5-12, (1998).
- [2] P. Michael Conn (1999) *Methods in Enzymology: Green fluorescence protein*, **302**: pp3-171.
- [3] Walmsley R.M., Billinton N., and Heyer W-D. (1997) Green fluorescent protein as a reporter for the DNA damage-induced gene RAD54 in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **13** (16): pp1535-1545.
- [4] Shibasaki S., Ueda M., Iizuka T., Hirayama M., Ikeda Y., Kamasawa N., Osumi M. and Tanaka A. (2001) Quantitative evaluation of the enhanced green fluorescent protein displayed on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* by fluorometric and confocal laser scanning microscopic analyses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**: pp471-475.
- [5] Kanai T., Atomi H., Umemura K., Ueno H., Teranishi Y., Ueda M. and Tanaka A. (1996) A novel heterologous gene expression system in *Saccharomyces cerevisiae* using the isocitrate lyase gene promoter from *Candida tropicalis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: pp759-765.
- [6] Sikorski, R. S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: pp19-27.
- [7] Ashikari T., Kiuchi-Goto N., Tanaka Y., Shibano Y., Amachi T. and Yoshizumi H. (1989) High expression and efficient secretion of *Rhizopus oryzae* glucoamylase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: pp515-520.
- [8] Murai T., Ueda M., Atomi H., Shibasaki Y., Kamasawa N., Osumi M., Kawaguchi T., Arai M., Tanaka A. (1997) Genetic immobilization of cellulase on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae*, *App. Microbiol. Biotechnol.*, **48**: pp499-503.
- [9] Sambrook J. and Russel W. D. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3^{ed}, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001).
- [10] Clontech, (1999) YeastmakerTM yeast transformation system user manual, PT1172-1, PR89821.
- [11] Erwin Z. and Gunther D. (1995) Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **11**: 493-536.
- [12] Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. *Essential Cell Biology*, Garland Publishing, Inc, pp452-462, (1998).