

ẢNH HƯỞNG CỦA HIS-TAG LÊN SỰ BIỂU HIỆN B-GALACTOSIDASE ĐƯỢC DUNG HỢP Ở ĐẦU N HOẶC C SỬ DỤNG PROMOTER PGRAC100 TRONG *BACILLUS SUBTILIS*

Phan Thị Phượng Trang, Nguyễn Đức Hoàng

Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.

Ngày nhận bài: 31.10.2014

Ngày nhận đăng: 30.12.2014

TÓM TẮT

Nằm trong định hướng phát triển hệ thống biểu hiện trên *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), hàng loạt các promoter mạnh đã được tạo thành dựa trên những cài tiền vùng -35, vùng -10, vùng -15, vùng trình tự giàu AT trước vùng -35 (UP element), trình tự khởi đầu phiên mã, nhân tố giúp làm bền mRNA, vùng SD (Shine-Dalgarno) từ promoter *Pgrac*, cho hiệu quả biểu hiện cao khi sử dụng chất cảm ứng là Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Trong đó, *Pgrac100* là một promoter khá mạnh cho phép biểu hiện β -galactosidase (*BgaB*) lên đến 30% protein tổng. Promoter này được thay đổi trên vùng UP element, vùng bảo tồn -35 và vùng -15 so với promoter *Pgrac*. Hệ thống *Pgrac100* bao gồm các vector *pHT253* (*Pgrac100-8xHis-MCS*) chứa His-tag ở đầu N và *pHT254* (*Pgrac100-MCS-8xHis*) chứa His-tag ở đầu C. Tuy nhiên, ảnh hưởng việc dung hợp His-tag vào đầu C hoặc N của protein mục tiêu chưa được khảo sát. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng *BgaB* như một protein chỉ thị nhằm khảo sát ảnh hưởng của đuôi tinh chế His-tag lên sự biểu hiện của *BgaB* khi dung hợp vào đầu N hoặc C trong *B. subtilis*. Plasmid *pHT1178* mang chỉ thị được dung hợp với His-tag ở đầu N được tạo ra. Ba plasmid *pHT100* (*BgaB*), *pHT1178* (*His-BgaB*) và *pHT1179* (*BgaB-His*) được biến nạp vào các chủng *B. subtilis* 1012 và mức độ biểu hiện của *BgaB* được xác định bằng cách đo hoạt tính và SDS-PAGE. Kết quả cho thấy việc dung hợp đuôi His-tag vào đầu N của protein *BgaB* đã làm giảm đáng kể sự biểu hiện của protein này ở *B. subtilis*. Nghiên cứu này có ý nghĩa trong việc giúp định hướng cho người sử dụng lựa chọn vector phù hợp cho việc biểu hiện và tinh chế protein tái tổ hợp trong *B. subtilis* phục vụ trong nghiên cứu và sản xuất.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, β -galactosidase, His-tag, *Pgrac100*, *pHT253*, *pHT254*

MỞ ĐẦU

Bacillus subtilis (*B. subtilis*) là một trong những chủng vi sinh vật được lựa chọn hàng đầu trong ngành công nghệ sản xuất protein tái tổ hợp dùng trong lâm sàng như interferon, insulin, kháng nguyên và các độc tố, hay các enzyme trong công nghiệp như protease, lipase, amylase,... (Ho, Lim, 2003). Thuận lợi của *B. subtilis* so với những chủng chủ khác được thể hiện thông qua đặc tính an toàn dùng trong thực phẩm, có khả năng lên men ở mật độ cao, khả năng tiết protein mục tiêu không chỉ thuận lợi cho việc thu nhận và tinh sạch protein tái tổ hợp mà còn cần tin sự tạo thành các thể vùi; một lượng lớn thông tin liên quan đến phiên mã, dịch mã, gấp cuộn đã được làm rõ và không có sự sai lệch (bias) đáng kể trong việc sử dụng codon (Wong, 1995). Hơn nữa, hệ thống vector phù hợp (pHT) được phát triển mạnh trong vài năm gần đây đã mở ra những tiềm năng ứng dụng to lớn cho *B. subtilis*.

Tất cả các vector pHT cho đến nay đều sử dụng các promoter có nguồn gốc từ promoter *Pgrac* (Phan et al., 2006) nhưng mang các biến đổi về trình tự nhằm tăng hiệu quả điều hòa biểu hiện gen mục tiêu. Trong đó, *Pgrac100* là một promoter mạnh được sử dụng trong vector *pHT100*, được phân phối trên thị trường từ năm 2012 bởi công ty Sinh học phân tử Mobitec, cho phép biểu hiện β -galactosidase (*BgaB*) lên đến 30% protein tổng số (Phan et al., 2012). Độ mạnh của *Pgrac100* được cải thiện thông qua ba yếu tố: (i) vùng UP element giàu AT có nguồn gốc từ vùng upstream của *groESL* operon, (ii) vùng -35 mang trình tự bảo tồn TTGACA và (iii) vùng -15 hay còn gọi là vùng -10 mở rộng mang trình tự ATG (Aiyar et al., 1998). Với những cải tiến so với *Pgrac*, *Pgrac100* đã chứng minh những yếu tố trên là cần thiết cho một promoter mạnh trong *B. subtilis*, bằng chứng là hoạt động phiên mã tăng gấp 40 lần (Phan et al., 2012) so với *Pgrac* và cho những kết quả khá quan về sản lượng sản xuất protein tái tổ hợp.

Để tạo thuận lợi cho quá trình tinh sạch protein mục tiêu thì việc dung hợp protein đó với một đuôi tinh chế phù hợp đang là cách tiếp cận phù hợp. Không nằm ngoài cách tiếp cận trên, hệ thống vector pHT đã được phát triển với xu hướng tích hợp các đuôi tinh chế hiệu quả. Vẫn là một đuôi tinh chế phổ biến, His-tag được chọn do mang những thuận lợi: (i) kích thước nhỏ, hạn chế tính miễn dịch, không cần được loại bỏ; (ii) có thể được tinh chế dưới điều kiện biến tính; (iii) quy trình sử dụng dễ dàng (Hochuli *et al.*, 1988). Hai trong số các vector sử dụng Pgrac100 là pHT253 (Pgrac100-8xHis-MCS) và pHT254 (Pgrac100-MCS-8xHis) được phân phối trên thị trường thế giới, cũng đã được thiết kế để chứa 8xHis-tag ở đầu N và đầu C của protein mục tiêu, giúp tăng thêm phần tiện lợi cho người sử dụng khi cần tinh sạch protein mục tiêu.

Tuy nhiên, việc lựa chọn dung hợp 8xHis-tag vào đầu N hoặc C của protein mục tiêu cần phải được khảo sát vì có thể sẽ ảnh hưởng đến sự biểu hiện của protein này (Ledent, 1997). Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng BgaB như một protein chỉ thị nhằm khảo sát ảnh hưởng của đuôi tinh chế 8xHis-tag lên sự biểu hiện của BgaB khi dung hợp vào đầu N hoặc C trong *B. subtilis*. Đây là một thông tin rất quan trọng để người sử dụng có những định hướng lựa chọn vector thích hợp cho mục tiêu nghiên cứu. 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 hoạt tính BgaB trong môi trường rắn và lỏng trên *B. subtilis*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật, vector và môi trường nuôi cấy

E. coli OmniMAX (Invitrogen, Mỹ) 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 BgaB trong thí nghiệm này. Vector được sử dụng là pHT253, với His-tag dung hợp vào vùng MCS ở đầu N. Gen *bgaB* mã hóa enzyme β -galactosidase từ *Bacillus stearothermophilus* được chèn vào vùng MCS của vector pHT253 như một gen chỉ thị. Kết quả tạo vector pHT1178 mang gen *8xHis-bgaB* được điều hòa biểu hiện bởi promoter Pgrac100. Thí nghiệm được thực hiện với đối chứng là vector pHT100 có cấu trúc tương tự như vector pHT1178 nhưng không mang trình tự *8xHis*. Ngoài ra, vector pHT1179 có cấu trúc tương tự như pHT1178, được tạo ra bằng cách đưa gen mã hóa *bgaB* dung hợp với His-tag vào vùng MCS của

pHT254, trong đó His-tag được dung hợp ở đầu C (được tạo ra trong một công bố khác). Tế bào *B. subtilis* được nuôi cấy trên môi trường Luria, broth (LB) ở 37°C, với kháng sinh chloramphenicol 10 μ g/ml.

Tạo vector pHT1178

Đoạn gen *bgaB* có kích thước 2034 bp được thu nhận từ phản ứng PCR, sử dụng cặp mồi ON941 (5'-AAAGGAGGAAGGATCCATGAATGTGTTATC-3') và ON224 (5'-CCGGATGACGTCGAATTCTAAACCTTCCCGGCTTCATCATG-3') và vector pNDH33-*bgaB* (Phan *et al.*, 2006) làm khuôn. Đoạn gen sau khi thu được và vector gốc pHT253 được cắt với 2 enzyme cắt *Bam*HI và *Aat*II, sau đó nối bằng enzyme T4 ligase để tạo vector tái tổ hợp pHT1178. Sản phẩm nối được biến nạp vào chủng *E. coli* OmniMAX, sàng lọc và kiểm tra đoạn chèn bằng giải trình tự với các mồi ON314 (5'-TGTTTCAACCATTGTTCAGGT-3'), ON954 (5'-GCCTTACAAAATCGACAGCAATATTACG-3') và ON1249 (5'-CGTTTCCACCGGAATTAGCTTG-3') trước khi biến nạp vào chủng *B. subtilis* 1012.

Khảo sát hoạt tính β -galactosidase (BgaB) trên môi trường rắn

Các khuẩn lạc đơn *B. subtilis* chứa vector pHT01 (Nguyễn *et al.*, 2007), pHT100 (Phan *et al.*, 2012), pHT1178, pHT1179 được khảo sát hoạt tính BgaB nhằm đánh giá ảnh hưởng của 8xHis-tag. Thí nghiệm được tiến hành trên đĩa LB chứa 2 μ g/ml X-gal và 6 nồng độ IPTG (0, 0,001, 0,01, 0,1, 0,5 và 1 mM) với 10 μ g/ml chloramphenicol. Ủ trong 16 giờ ở 37°C và quan sát màu xanh của khuẩn lạc. BgaB cho hoạt tính thủy phân X-gal thành 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo, một chất có màu xanh dương. Như vậy, độ đậm của màu xanh trên khuẩn lạc phản ánh hoạt tính của BgaB, qua đó đánh giá được ảnh hưởng của His-tag lên biểu hiện cũng như hoạt tính của BgaB. Hình ảnh được ghi nhận bằng máy chụp hình kỹ thuật số và được phân tích bằng phần mềm AlphaEaseFC (Alpha Inotech, Đức) 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 BgaB

Tiến hành nuôi cấy *B. subtilis* 1012 chứa các vector pHT01, pHT100, pHT1178, pHT1179 trong môi trường LB với kháng sinh chloramphenicol (10 μ g/ml)

ở 37°C và tốc độ lắc 180 vòng/phút. Cảm ứng bằng IPTG tại thời điểm OD₆₀₀ đạt 0,8 – 1 với các nồng độ 0, 0,001, 0,01, 0,1, 0,5 và 1 mM. Thu mẫu 0, 2, 4 giờ sau cảm ứng sao cho OD₆₀₀ 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 chứng âm 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 BgaB trên đĩa 96 giếng.

Kiểm tra sự biểu hiện bằng SDS PAGE

Hòa tan sinh khối trong 100 µl đệm ly giải (0,1 M Na₂HPO₄; 0,1 M NaH₂PO₄; 1 mM MgCl₂), 5µl lysozyme 50 mg/ml, ủ ở 37°C trong 5 phút, sau đó thêm 30µl đệm nạp mẫu 5X (0,135 M Tris/HCl, 30% glycerol, 3% SDS, 0,03% bromophenol blue, 0,15 M DTT). 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 và đánh giá khả năng biểu hiện protein mục tiêu thông qua độ đậm của vạch BgaB trên protein tổng.

Khảo sát hoạt tính β-galactosidase trên đĩa 96 giếng

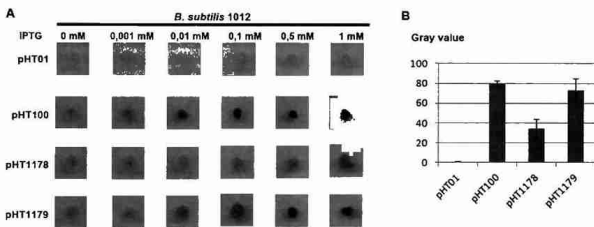
Ở nhiệt độ 55°C, β-galactosidase có khả năng phân cắt ONPG (o-nitrophenol-β-D-galactoside) tạo

ONP (o-nitrophenol) có màu vàng và được hấp thu tại bước sóng 420 nm (Phan *et al.*, 2010). Mẫu tế bào *B. subtilis* 1012 mang các vector cần khảo sát được đo hoạt tính β-galactosidase theo như quy trình đã được thiết lập (Mogk *et al.*, 1996) và đo trên đĩa 96 giếng với máy đọc đĩa (BioTek-Thermo, Mỹ). Kết quả được xử lý và tính toán bằng phần mềm Excel (Microsoft, Mỹ). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần trên 3 khuẩn lạc khác nhau.

KẾT QUẢ

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

Trong thí nghiệm này chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của 8xHis-tag bằng cách quan sát mức độ biểu hiện của BgaB trên môi trường rắn. Khuẩn lạc đơn *B. subtilis* 1012 mang vector pHT100, pHT1178 và pHT1179 được chấm lên đĩa LB chứa X-gal với 6 nồng độ IPTG khác nhau, ủ 16 giờ ở 37°C. Thực hiện thí nghiệm đồng thời với mẫu chứng âm *B. subtilis* 1012 mang vector pHT01. Độ đậm của màu xanh trên khuẩn lạc phản ánh mức độ biểu hiện BgaB. Để thuận lợi cho việc so sánh, ở mỗi đĩa, ứng với mỗi vector, chúng tôi chọn 1 tế bào và xếp gần nhau như trong hình 1A.



Hình 1. Khảo sát hoạt tính β-galactosidase trên đĩa thạch X-gal (A) và phân tích độ đậm bằng AlphaEase (Alpha Inotech) tại nồng độ 0,1 mM IPTG (B) của *B. subtilis* 1012 mang vector pHT100, pHT1178, pHT1179, sử dụng chứng âm là pHT01.

Kết quả hình 1 cho thấy, chứng âm không xuất hiện màu xanh trên khuẩn lạc. Trong khi đó, chủng mang vector pHT1178 và pHT1179 cho khuẩn lạc màu xanh trên tất cả các nồng độ IPTG với độ đậm tăng dần theo chiều tăng của chất cảm ứng. Kết quả này cho thấy, pHT1178 và pHT1179 với đuôi cung hợp His-tag ở đầu N và đầu C của

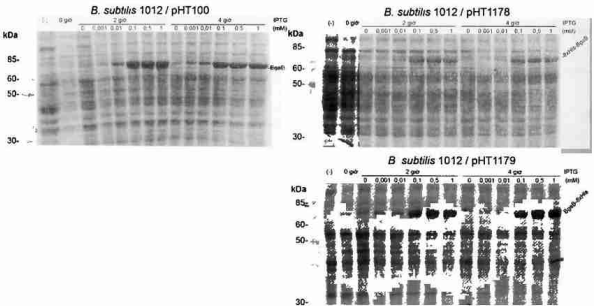
BgaB, theo thứ tự, vẫn cho khả năng biểu hiện protein mục tiêu; ngay cả ở những nồng độ IPTG thấp (0, 0,001 và 0,01 mM) Tuy nhiên, khi so sánh với pHT100 (không mang đuôi cung hợp His-tag), chúng tôi nhận thấy mức độ biểu hiện của pHT1178 giảm rõ rệt ở tất cả các nồng độ, trong khi pHT1179 vẫn giữ được khả năng biểu

hiện tốt (Hình 1B). Cả ba vector pHT100, pHT1178 và pHT1179 đều sử dụng cùng một loại promoter là *Pgrac100*, như vậy, sự hiện diện của His-tag tại đầu N của gen mục tiêu trong pHT1178 có khả năng đã ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của BgaB. Để kiểm chứng kết quả này, chúng tôi tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

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

Để đánh giá độ mạnh của các promoter trong việc biểu hiện BgaB trong môi trường lỏng, hai chủng *B. subtilis* 1012/pHT1178 và *B. subtilis* 1012/pHT1179 được nuôi cấy và cảm ứng cùng 1 điều kiện như đã mô tả ở phần Vật liệu và Phương pháp. Mẫu tế bào được thu ở các thời điểm 0, 2 và 4 giờ và protein nội bào tổng số được tiến hành phân tích bằng điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamide 12%. Protein bắt màu với thuốc nhuộm Coomassie Blue cho vạch màu xanh trên gel.

Kết quả tại hình 2 cho thấy, cả hai chủng *B. subtilis* mang vector cần khảo sát đều cho vạch protein mục tiêu xuất hiện ở các thời điểm 2 và 4 giờ sau khi cảm ứng bằng IPTG và biểu hiện với hàm lượng lớn khi tế bào được cảm ứng ở nồng độ 0,1, 0,5 hoặc 1 mM IPTG, trong khi chứng âm (-) là pHT01 hoàn toàn không xuất hiện vạch tương ứng trên gel. Kích thước protein được biểu hiện tốt phù hợp với kích thước lý thuyết của protein mục tiêu (~78 kDa). So sánh giữa hai vector pHT1178 và pHT1179 với pHT100, chúng tôi nhận thấy mức độ biểu hiện của BgaB được dung hợp 8xHis-tag ở đầu N (pHT1178) giảm hơn so với BgaB dung hợp với 8xHis-tag ở đầu C (pHT1179) và không dung hợp đuôi His (pHT100). Tương tự kết quả khảo sát trên đĩa thạch Xgal, kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy việc dung hợp đuôi His-tag vào đầu N đã ảnh hưởng đến sự biểu hiện của BgaB. Thí nghiệm khảo sát hoạt tính BgaB sẽ giúp chúng tôi có những nhận định chính xác hơn về vấn đề này.



Hình 2. Kết quả điện di SDS-PAGE ba chủng *B. subtilis*/ pHT100, *B. subtilis*/ pHT1178 và *B. subtilis*/ pHT1179. M, Thang protein, (-), *B. subtilis*/pHT01. Mẫu thu ở 0, 2, 4 giờ sau khi cảm ứng với IPTG ở 6 nồng độ khác nhau.

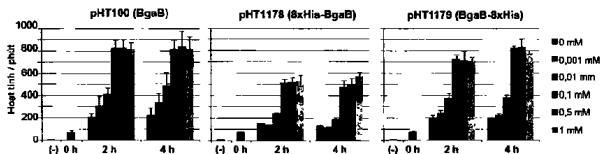
Đánh giá ảnh hưởng của 8xHis-tag trong môi trường lỏng thông qua hoạt tính của BgaB

Thí nghiệm khảo sát hoạt tính BgaB trên đĩa thạch và điện di SDS-PAGE chỉ đánh giá hoạt tính và khả năng biểu hiện BgaB sơ bộ thông qua cảm quan về màu sắc và độ đậm của vạch protein trên gel, khảo sát hoạt

tính trên đĩa 96 giếng cho kết quả ở dạng các số liệu được đo bằng máy đọc đĩa nên có độ tin cậy cao hơn. Độ đậm của màu vàng tỷ lệ thuận với lượng β -galactosidase do chủng mang vector cần khảo sát biểu hiện. Số liệu được xử lý và trình bày dưới dạng đồ thị hình 3.

Kết quả hình 3 cho thấy, cả ba vector đều cho hoạt tính BgaB tăng dần theo nồng độ cảm ứng, mạnh nhất ở 3 nồng độ 0,1, 0,5 hoặc 1 mM IPTG khi biểu hiện trong *B. subtilis* 1012, mức độ biểu hiện tại thời điểm 2 và 4 giờ là tương đương nhau. Hoạt tính cao nhất được ghi nhận của pHT1178 (~ 600 đơn vị hoạt tính) bằng ¼ so với pHT100 và pHT1179 (~ 800 đơn vị hoạt tính). Như vậy, His-tag dung hợp với protein BgaB tại đầu N đã ảnh hưởng

đến sự biểu hiện của protein này. Kết quả có được hoàn toàn phù hợp với những kết quả từ các thí nghiệm trước. Hiện tượng giảm biểu hiện protein mục tiêu trong trường hợp này có liên quan đến vị trí của His-tag so với protein tái tổ hợp. Có khả năng đầu N của BgaB có vai trò quan trọng việc biểu hiện cũng như quyết định hoạt tính, cho nên việc gắn chèn đuôi His-tag vào đầu N đã ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme này



Hình 3. Kết quả khảo sát hoạt tính BgaB của *B. subtilis* 1012/ pHT100 (BgaB), *B. subtilis* 1012/ pHT1178 (8xHis-BgaB) và *B. subtilis* 1012/ pHT1179 (BgaB-8xHis).

THẢO LUẬN

Việc tinh chế protein rất quan trọng vì từ protein tinh sạch chúng ta có thể xác định được trình tự amino acid, khảo sát các chức năng sinh hóa, xác định cấu trúc thứ cấp cũng như các đơn vị chức năng của chúng. Các thông tin này rất có ý nghĩa đối với các protein có hoạt tính y dược, các kháng nguyên được sử dụng trong sản xuất kháng thể. Do đó, việc lựa chọn một đuôi tinh chế phù hợp và vị trí dung hợp hiệu quả đối với gen mục tiêu là rất quan trọng. Không nằm ngoài mục tiêu đó, trong nghiên cứu này, gen *bgaB* được chèn vào pHT253 và pHT254 như một gen chỉ thị, kết quả tạo ra hai dạng dung hợp của 8xHis-tag với BgaB ở đầu N (pHT1178) và đầu C (pHT1179) nhằm xác định sự biểu hiện của BgaB có thật sự bị ảnh hưởng bởi đuôi dung hợp 8xHis-tag hay không.

Sự biểu hiện của BgaB dung hợp với His-tag tại đầu C trong pHT1179 cho kết quả tương đương so với BgaB không chứa His-tag trong pHT100 và cao hơn so với sự biểu hiện BgaB khi có His-tag dung hợp với đầu N trong pHT1178; chứng tỏ vị trí của His-tag so với protein mục tiêu có ảnh hưởng đến sự biểu hiện và hoạt tính của protein đó. Cụ thể trong trường hợp này là việc His-tag gắn vào đầu N đã làm giảm biểu hiện của BgaB.

Tuy nhiên, đây không phải là thông tin chung cho tất cả các loại protein mục tiêu. Hiện nay, có rất nhiều hệ thống vector biểu hiện trên thế giới được thiết kế sao cho gen *his* nằm trước vùng MCS, do đó, các gen mục tiêu sử dụng các vector này đều cho biểu hiện cùng với His-tag dung hợp ở đầu N của protein mục tiêu. Vector pHT253 nằm trong hệ thống vector pHT, được thương mại hóa vào năm 2012, cũng là một trong số đó. Việc ảnh hưởng hay không của vị trí đuôi tinh chế đến sự biểu hiện protein mục tiêu đó. Khi một protein có các trình tự tín hiệu hoặc có vùng hoạt tính nằm ở đầu N thì việc gắn His-tag vào vị trí này sẽ dẫn đến tương tác giữa polyhistidine với các nhóm polypeptide trong protein mục tiêu. Đặc biệt là khi vùng hoạt động mang điện tích âm tích âm thì những histidine mang điện tích dương trong His-tag nằm gần đó có khả năng làm bất hoạt protein mục tiêu. Không chỉ ở đầu N mà đầu C cũng có thể xảy ra những trường hợp tương tự. Do đó, việc quyết định sử dụng đuôi tinh chế His-tag ở đầu C hoặc đầu N là tùy thuộc vào protein mục tiêu (Ledent, 1997).

His-tag vốn được biết đến như một đuôi tinh chế với kích thước nhỏ (6 – 10 histidine) và không ảnh hưởng nhiều đến protein dung hợp. Tuy nhiên, trong một vài trường hợp, His-tag vẫn có khả năng tác động đến sự biểu hiện cũng như hoạt tính của protein mục tiêu. Để có những thông tin chính xác, việc thử

thực nghiệm hoạt tính protein mục tiêu dung hợp với His-tag trong cả 2 trường hợp (đầu N hoặc đầu C) và so sánh với khi không dung hợp là rất cần thiết. Một cách giải quyết vấn đề này thiết kế một vị trí cắt giữa His-tag và protein mục tiêu để có thể loại bỏ đuôi His-tag dễ dàng sau tinh chế nhằm tránh những ảnh hưởng không mong muốn đến protein mục tiêu.

KẾT LUẬN

Sự dung hợp với His-tag đã ảnh hưởng đến sự biểu hiện của BgaB, đặc biệt là khi His-tag dung hợp với đầu N, hoạt tính BgaB giảm còn $\frac{1}{4}$ so với khi không dung hợp và dung hợp ở đầu C. Đây cũng là một thông tin quan trọng trong chiến lược sử dụng đuôi tinh chế His-tag dung hợp với BgaB nói riêng và protein mục tiêu nói chung.

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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aiyar SE, Gourse RL, Ross W (1998) Upstream A-tracts increase bacterial promoter activity through interactions with the RNA polymerase alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14652-14657.
- Ho KM, Lim BL (2003) Co-expression of a prophage system and a plasmid system in *Bacillus subtilis*. *Protein Expr Purif* 32: 293-301.
- Hochuli E, Bannwarth W, Döbeli H (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins

with a novel metal chelate adsorbent. *Nat Biotechnol* 6: 1321-1325.

Bacillus subtilis Pgrac100 Expression Vectors. In. http://www.mobitec.com/cms/products/bio/04_vector_sys/b_subtilis_pgrac100.html.

Mogk A, Hayward R, Schumann W (1996) Integrative vectors for constructing single-copy transcriptional fusions between *Bacillus subtilis* promoters and various reporter genes encoding heat-stable enzymes. *Gene* 182: 33-36.

Nguyen HD, Phan TTP, Schumann W (2007) Expression vectors for the rapid purification of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol* 55: 89-93.

Ledent P, Duez C, Vanhove M, Lejeune A, Fonze E, Charlier P, Rhazi-Filali F, Thamm J, Guillaume G, Samyn B, Devreese B, Beeumen J, Lamotte-Brasseur J, Frère JM (1997) Unexpected influence of a C-terminal-fused His-tag on the processing of an enzyme and on the kinetic and folding parameters. *FEBS Lett* 413: 194-6

Phan TTP, Nguyen HD, Schumann W (2006) Novel plasmid-based expression vectors for intra- and extracellular production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Protein Expr Purif* 46: 189-195.

Phan TTP, Nguyen HD, Schumann W (2012) Development of a strong intracellular expression system for *Bacillus subtilis* by optimizing promoter elements. *J Biotechnol* 157: 167-172

Phan TTP, Nguyen HD, Schumann W (2010) Establishment of a simple and rapid method to screen for strong promoters in *Bacillus subtilis*. *Protein Expr Purif* 71: 174-178.

Wong SL (1995) Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. *Curr Opin Biotechnol* 6: 517-522.

THE EFFECTS OF HIS-TAG FUSION AT N- OR C-TERMINUS ON THE EXPRESSION OF β -GALACTOSIDASE USING PGRAC100 PROMOTER IN *BACILLUS SUBTILIS*

Phan Thi Phuong Trang, Nguyen Duc Hoang

University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh City

SUMMARY

By the aim of developing expression system for *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), a series of strong promoters was constructed by the improvements of the -35 element, the -10 element, the -15 region, UP element, transcriptional start site, stabilizing element and Shine-Dalgarno (SD) sequence from Pgrac promoter, which have had high expression levels of recombinant proteins using Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) as an inducer. Among them Pgrac100 which is an outstanding promoter allows expressing BgaB up to 30%. This promoter was modified at UP element, -35 consensus region and -15 region in comparison with Pgrac promoter. Pgrac100 system includes pHT253 plasmid (Pgrac100-8xHis-MCS) containing His-tag at N-terminal and pHT254 plasmid (Pgrac100-MCS-8xHis) containing His-tag at C-terminal. However, the

influence of His-tag on expression of target protein has not been investigated. In this study, we use β -galactosidase (BgaB) as a reporter protein to investigate the influence of His-tag on the expression of BgaB in the fusion form at the N or C-terminal in *B. subtilis*. Plasmid pHT1178 (His-BgaB) harboring the reporter gene fused with His-tag at the N terminal was constructed. Three plasmids, pHT100 (BgaB), pHT1178 and pHT1179 (BgaB-His) were transformed into *B. subtilis* 1012 and the expression levels of BgaB were measured by activity-based assay and SDS-PAGE. The results showed that the His-tag which fused at N-terminal reduced significantly the expression of BgaB in *B. subtilis*. The study concerning the expression levels of the reporter protein fused at the N or C will provide an option for selection of suitable expression vector for production of recombinant proteins in *B. subtilis*.

Keywords: *Bacillus subtilis*, β -galactosidase, His-tag, Pgrac100, pHT253, pHT254