

BIỂU HIỆN KINASE cSrc TRONG *BACILLUS SUBTILIS* VÀ TINH CHẾ ĐỀ SÀNG LỌC CHẤT GẮN BẰNG PHƯƠNG PHÁP FLiK

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: 01.7.2014

Ngày nhận đăng: 30.8.2014

TÓM TẮT

cSrc là một protein tyrosine kinase không chứa thụ thể được mã hóa bởi gen *SRC*. Gen này tương tự như gen gây bệnh ung thư *SRC* của virus sarcoma, mã hóa cho vSrc. Sự hoạt hóa cSrc được ghi nhận xuất hiện trong khoảng 50% khối u có nguồn gốc từ ruột kết, gan, phổi, vú và tụy. Việc sàng lọc các chất bám vào các kinase này có vai trò quan trọng trong việc phát triển thuốc ức chế sự phát triển của các khối u. Phương pháp FLiK (Fluorescence Label in Kinase) dựa trên việc đánh dấu huỳnh quang trong kinase, được phát triển trong những năm gần đây cho phép sàng lọc chất bám vào kinase nhằm phát hiện các chất ức chế nằm trong hay ngoài túi gắn ATP. Protein kinase cSrc cho FLiK đã được biểu hiện trên *Escherichia coli*. tuy nhiên việc biểu hiện không ổn định sau khi giữ lạnh chúng một thời gian. Trong báo cáo này, chúng tôi trình bày việc biểu hiện cSrc trong *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) và tinh chế bằng phương pháp sắc ký ái lực. Sự biểu hiện protein này ở *B. subtilis* khá ổn định sau khi chúng được hoạt hóa trở lại từ tủ đông. Kinase tinh sạch sau đó được đánh dấu huỳnh quang sử dụng chất acrylodan. Khối lượng phân tử của các enzyme này được xác định bằng LC-ESI-MS (liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry). Protein được tạo ra có đánh dấu huỳnh quang đã có thể được sử dụng trong sàng lọc chất gắn vào kinase theo phương pháp FLiK.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, kinase cSrc, FLiK, plasmid pHT

MỞ ĐẦU

cSrc là một protein tyrosine kinase nội bào không chứa thụ thể được mã hóa bởi gen *SRC*. Gen này có cấu trúc tương tự như gen gây bệnh ung thư *SRC* của virus sarcoma (vSrc) (Wheeler *et al.*, 2009). Sự hoạt hóa cSrc được ghi nhận xuất hiện trong khoảng 50% khối u có nguồn gốc từ ruột kết, gan, phổi, vú và tụy (Dehm, Bonham, 2004). Do vậy, cSrc đã trở thành protein mục tiêu cho việc nghiên cứu ức chế nhằm làm hạn chế sự phát triển khối u. cSrc được tạo thành từ 6 vùng chức năng: domain 4 tương đồng với các protein Src khác (SH4 domain), vùng duy nhất, SH3 domain, SH2 domain, domain có hoạt tính và một đuôi điều hòa ngắn (Okada, Nakagawa, 1989; Nada *et al.*, 1991). Trong đó domain có hoạt tính kinase có vai trò quan trọng nhất và thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học để nghiên cứu việc ức chế sự hoạt động của protein cSrc. Một trong các nghiên cứu đáng lưu ý thời gian gần đây trong việc sàng lọc chất bám vào cSrc là sử dụng phương pháp đánh dấu huỳnh quang lên protein kinase – phương pháp FLiK (fluorescence label in kinase). Chất phát huỳnh quang, acrylodan được gắn lên protein kinase ngay sau motif DFG

(DFG+1) nằm trên vùng A loop. Để đánh dấu chính xác tại vị trí này, leucine ở vị trí DFG-1 được thay thế bằng cysteine, trong khi đó cysteine ở các vị trí khác được thay bằng serine. Khi gắn thêm một phân tử (binder) vào vùng gần DFG trên protein có mang acrylodan sẽ làm thay đổi môi trường xung quanh acrylodan. Sự thay đổi môi trường này dẫn đến sự thay đổi phổ và cường độ huỳnh quang được phát ra. Việc đo các thay đổi nhỏ về huỳnh quang này sẽ cho phép sàng lọc các phân tử nhỏ bám vào vùng trong hay ngoài túi ATP (Smard *et al.*, 2009). Trong nghiên cứu trên cSrc dùng cho FLiK được biểu hiện trong *Escherichia coli* (*E. coli*), tuy nhiên, trong quá trình thực hiện chúng tôi nhận thấy rằng sự biểu hiện protein này không ổn định sau khi chúng được giữ ở tủ lạnh 4°C hay -80°C.

Để giải quyết việc biểu hiện không ổn định, phương án sử dụng một hệ thống biểu hiện *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) được lựa chọn. Giống như *E. coli*, hệ thống biểu hiện *B. subtilis* có nhiều ưu điểm như phát triển nhanh và dễ thao tác, khi so với hệ thống nấm men, tế bào cồn trung và tế bào động vật. Trong thời gian gần đây, hệ thống biểu hiện cho *B. subtilis* đang được phát triển và hoàn thiện dần.

Plasmid cảm ứng biểu hiện mạnh với promoter *Pgrac* (Phan *et al.*, 2006), có thể sử dụng để biểu hiện protein tái tổ hợp được phát triển từ năm 2007 (Nguyễn *et al.*, 2007). Dựa trên promoter *Pgrac*, thư viện các promoter mạnh dùng cho mục đích biểu hiện protein tái tổ hợp cũng đã được tạo ra (Phan *et al.*, 2010, 2012).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tổng hợp đoạn DNA mã hóa cho domain có hoạt tính kinase của cSrc trong đó có chứa các đột biến cần thiết để đánh dấu huỳnh quang vào plasmid biểu hiện cho *B. subtilis*. Sự biểu hiện protein của chủng *B. subtilis* giữ lạnh được khảo sát và được tinh chế. Protein tinh sạch sau đó được đánh dấu bằng acrylodan và kiểm tra khối lượng phân tử bằng LC-ESI-MS (liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry). Khả năng sử dụng protein có mang acrylodan để sàng lọc các chất bám được kiểm tra với erlotinib, một chất đã được biết là có khả năng bám lên vị trí domain kinase của cSrc.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng vi sinh vật, plasmid và môi trường nuôi cấy

E. coli OmniMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA) được dùng để tổng hợp và *B. subtilis* 1012 (*leuA8 metB5 trpC2 hsdRMI*) được dùng để biểu hiện protein tái tổ hợp. Các chủng vi sinh vật được giữ trên đĩa Petri ở 4°C hoặc ở -80°C trong 15% glycerol. Plasmid pHT212 (Phan *et al.*, 2010) dùng làm plasmid khung để thiết kế plasmid biểu hiện và plasmid pHT320 dùng làm khuôn để khuếch đại gen dung hợp mã hóa cho LysSN-His-TEV được cung cấp bởi Công ty TNHH Công nghệ Sinh học HT. Plasmid pOPIN-F-cSrc (Simard *et al.*, 2009) dùng làm khuôn để khuếch đại gen mã hóa cho cSrc. Gen mã hóa cho kinase cSrc được sử dụng trong nghiên cứu này có nguồn gốc từ gà, nhưng trình tự protein của nó tương đồng 100% với domain kinase cSrc của người. Plasmid tái tổ hợp pHT1087 có sơ đồ cấu trúc như Hình 1 được sử dụng để khảo sát sự biểu hiện. Tế bào *E. coli* và *B. subtilis* được nuôi cấy lắc trên môi trường Luria broth (LB) ở 37°C hoặc 23°C, kháng sinh được thêm vào với nồng độ tương ứng (ampicillin 100 µg/ml đối với *E. coli* và chloramphenicol 10 µg/ml đối với *B. subtilis*).

Tạo plasmid pHT1087 (*Pgrac212-LysSN-His-TEV-cSrc*)

Đầu tiên, plasmid pHT1046 (*Pgrac212-cSrc*) có mang gen mã hóa cho domain có hoạt tính kinase

của cSrc chịu sự kiểm soát của promoter *Pgrac212* được thiết kế như sau. Gen mã hóa cho domain có hoạt tính của cSrc được khuếch đại sử dụng cặp mồi, SRC_F, 5'-CCAGGGATCCGTGGCGGCGCAGGATGAATTATCG-3' (vị trí cắt của *Bam*HI được gạch dưới) và SRC_R, 5'-TGCCCCGGGGACGTTATTTTCAAATTGCGGATGGCTCCAAGCGTTAGAGTGGTTCCTCAGATGC-3' (vị trí cắt của *Sma*I được gạch dưới) với khuôn pOPIN-F-CSK. Sản phẩm PCR được xử lý bằng *Bam*HI và *Sma*I, nối với pHT212 được xử lý *Bam*HI và *Sma*I. Sản phẩm nối nhờ T4 DNA ligase được biến nạp vào *E. coli* tạo pHT1046. Sau đó, plasmid pHT1087 được tạo ra bằng cách khuếch đại đoạn gen dung hợp có chứa *LysSN-His-TEV* từ pHT320 và chèn vào pHT1046 tại *Bam*HI sử dụng kit In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). Các mồi được sử dụng để khuếch đại đoạn gen dung hợp này gồm LysSN_F, 5'-TTAAAGGAGGAAGGATCTATGAGTCAAGAA GAACATAACCATGAA-3' và LysSN_R, 5'-CGCCCCACGGATCCCTGGAAGTACAGGTTCTACCGCCACCGCCAGAAGAATGATGATGATGATGGTGAGATCC-3' (vùng DNA gạch dưới cần cho dung hợp).

Các plasmid tạo thành được giải trình tự để kiểm tra tính nguyên vẹn và đồng khuôn của các đoạn gen. Hình 1A thể hiện sơ đồ của plasmid pHT1087, vùng promoter, gen mục tiêu và vị trí các mồi.

Khảo sát biểu hiện của protein mục tiêu và độ ổn định

Chủng *B. subtilis* mang các plasmid được nuôi cấy lắc trong môi trường LB ở các nhiệt độ 37°C hoặc 23°C. Tế bào được thu nhận sau 4 giờ cảm ứng IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) trong trường hợp nuôi cấy ở 37°C và sau 16 giờ trong trường hợp nuôi cấy ở 23°C. Tế bào được xử lý bằng lysozyme và phá vỡ tế bào bằng sonicator và mẫu này được gọi là protein tổng (T). Tiếp đến, mẫu tế bào bị phá vỡ sẽ được ly tâm 12000 rpm, trong 5 phút, trong eppendorf 1,5 ml và dịch nổi ở bên trên gọi là dịch hòa tan (S). Các dịch hòa tan này sau đó được trộn với các hạt agarose Ni-NTA (Qiagen, Limburg, Netherlands) và được rửa trên các cột ly tâm. Các protein có đuôi His-tag bám lên các hạt này sẽ được trộn với đệm nạp mẫu cho SDS-PAGE và mẫu này được gọi là His (Hình 1B). Để xác định độ ổn định sự biểu hiện cSrc dung hợp, chúng tôi giữ 3 tuần ở 4°C và 3 tháng ở -80°C được hoạt hóa và khảo sát sự biểu hiện tương tự như trên.

Tinh sạch protein cSrc

Tế bào được nuôi cấy ở 23°C và thu nhận tương tự như mục khảo sát biểu hiện. Tế bào được phá vỡ bằng lysozyme và sonicator trong đệm ly giải/đệm 1 (đệm NaPi 50 mM, pH = 8, NaCl 300 mM, DTT 1 mM, lysozyme 250 µg/ml, protease inhibitor 1 viên/50 ml, PMSF 1 mM). Mẫu được ly tâm lạnh và dịch nổi được lưu lại để cho qua cột HisTrap HP (GE HealthCare, Little Chalfont, UK) trên máy FPLC. Tất cả các bước qua cột đều được thực hiện ở từ 7°C. Tốc độ dòng cho qua cột là 2 ml/phút. Sau khi nạp mẫu, cột được rửa bằng đệm rửa cột/đệm 2 (đệm NaPi 50 mM, pH = 8, NaCl 300 mM, glycerol 5%, imidazole 20 mM, DTT 1 mM). Sau đó protein được thu nhận bằng đệm 3 (đệm NaPi 50 mM, pH = 8, NaCl 300 mM, glycerol 5%, imidazole 250 mM, DTT 1 mM) theo gradient nồng độ imidazole. Các phân đoạn có chứa protein cSrc dung hợp sẽ được thu nhận cho bước tiếp theo.

Protein được thu nhận ở trên sẽ được cất bằng TEV với tỉ lệ TEV so với protein mẫu là 1: 30 theo trọng lượng, trong 16 giờ, ở 7°C. Đệm chứa trong mẫu/đệm 4 được sử dụng trong phản ứng cất TEV (Tris-HCl 25 mM, pH 8, NaCl 100 mM, glycerol 5%, DTT 1 mM, EDTA 0,5 mM). Mẫu sau khi cất được loại bỏ EDTA sử dụng túi thẩm tích và nạp lại qua cột HisTrap HP trên máy FPLC. Thu nhận các mẫu đi qua cột và các mẫu được dung ly theo gradient nồng độ imidazole. Mẫu đi qua cột có chứa cSrc được pha loãng 5 lần sử dụng đệm 4 không chứa NaCl và nạp qua cột HiTrap Q FF 1 ml (GE HealthCare, Little Chalfont, UK) với tốc độ dòng 1 ml/phút trên máy FPLC. Cột sẽ được rửa bằng đệm 4 chứa 25 mM NaCl và sau đó protein được thu nhận sử dụng đệm dung ly/đệm 5 (Tris-HCl 25 mM, pH 8, NaCl 500 mM, Glycerol 5%, DTT 1mM) theo gradient nồng độ NaCl; phân tích các mẫu này trên SDS-PAGE để xác định các phân đoạn chứa protein mục tiêu, gom các mẫu này lại và chia thành từng ống nhỏ cất ở -80°C.

Đánh dấu huỳnh quang và đo khối lượng phân tử

Việc đánh dấu huỳnh quang được thực hiện theo qui trình đã được công bố (Simard *et al.*, 2009). Về cơ bản, protein cSrc được trộn với acrylodan (Invitrogen, Carlsbad, CA) theo tỉ lệ 1:1,5 và để qua đêm trong tối ở 4°C. cSrc có đánh dấu được rửa ba lần sử dụng Amicon (Milipore, Billerica, MA) bằng đệm đo hoạt tính/đệm 6 (50 mM Hepes, 200 mM NaCl, pH 7,45) để loại bỏ lượng acrylodan không phản ứng. Protein cSrc có đánh dấu được phân nhỏ

và giữ đông ở - 80°C. Mẫu protein có đánh dấu và không có đánh dấu acrylodan được thay đổi đệm bằng nước theo hướng dẫn sử dụng bộ kit DyeEx 2.0 Spin kit (Qiagen, Limburg, Netherlands). Mẫu sau đó sẽ được nạp vào LC-ESI-MS trên cột C4. Khối lượng phân tử của protein sẽ được tính toán bằng chương trình MagTran (<http://magtran.software.informer.com/>).

Kiểm tra khả năng sử dụng protein để sàng lọc

Kiểm tra khả năng sử dụng protein được thực hiện cho cSrc có đánh dấu acrylodan trong đĩa 384 giếng. Các hợp chất dasatinib, imatinib và erlotinib được hòa tan trong DMSO (dimethyl sulfoxide) ở nồng độ cao hơn 20 lần trước khi sử dụng. Các hợp chất được trộn với cSrc có đánh dấu ở nồng độ từ 10 nM đến 50 µM. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Mỗi một giếng chứa 1 µl các hợp chất và 19 µl đệm 6 chứa thêm 0,01% Brij-35 và 100 nM cSrc. Các đĩa được đậy bằng nắp nhôm dính và ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng và đọc cường độ huỳnh quang ở các bước sóng khác nhau sử dụng máy đọc đĩa Tecan Safire2. Kết quả được xử lý theo cách đã được công bố (Simard *et al.*, 2009).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

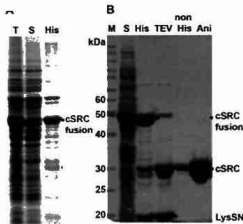
Tạo plasmid và kiểm tra biểu hiện

Plasmid pHT sử dụng vùng khởi đầu của plasmid pMTLBS72 (Titok *et al.*, 2003), cho phép sao chép theo kiểu theta nên giúp cho plasmid bền hơn về mặt cấu trúc trong tế bào. Promoter được sử dụng nghiên cứu này là một promoter mạnh, Pgrac212 kiểm soát sự biểu hiện gen thông qua việc cảm ứng bằng IPTG. Plasmid pHT212 được dùng làm khung. Gen mã hóa cho cSrc được đưa vào trong pHT212 thay thế cho gen *gbaB* tại vị trí *Bam*HI và *Sma*I để tạo thành plasmid pHT1046. Kế đó vùng DNA mã hóa cho đầu N của gen *lysSN* từ *B. subtilis* được dung hợp với His-tag và trình tự nhận biết của enzyme TEV được dung hợp với cSrc tại vị trí *Bam*HI tạo thành plasmid pHT1087. *lysSN* là gen mã hóa cho lysine-tRNA synthetase cho phép biểu hiện mạnh trong *B. subtilis*. Sử dụng gen biểu hiện này của chúng chủ dung hợp với gen mục tiêu sẽ cho phép gen mục tiêu có thể được biểu hiện tốt hơn. His-tag giúp cho việc tinh chế trong khi đó vị trí nhận biết của TEV sẽ giúp cho việc loại bỏ đuôi dung hợp và thu nhận cSrc được dễ dàng.

Plasmid được biến nạp vào *B. subtilis* và khảo sát sự biểu hiện của protein dung hợp. Ở nhiệt độ

37°C, protein dung hợp biểu hiện rất cao nhưng hầu hết protein đều không ở dạng hòa tan (kết quả không thể hiện). Ở nhiệt độ 23°C, cSrc dung hợp cũng biểu hiện khá cao (Hình 1A, giếng T) và cho thấy protein có ở dạng tan (Hình 1A, giếng S). Khi trộn mẫu protein dạng tan với hạt agarose Ni-NTA, rửa và dung ly, kết quả cho thấy cSrc dung hợp có thể bám hạt (Hình 1A, giếng His). Để khảo sát độ ổn định, các đĩa Petri được giữ 3 tuần ở tủ lạnh 4°C và ống giống được giữ 3 tháng ở tủ lạnh -80°C được rìa lại trên đĩa và chọn 5 khuẩn lạc cho mỗi điều kiện để

khảo sát sự biểu hiện. Kết quả khảo sát biểu hiện được ghi nhận cho thấy tất cả các khuẩn lạc đều cho lượng protein biểu hiện tan và khả năng bám lên cột tương tự như ở hình 1A. Trong khi đó, các chủng *E. coli* có mang plasmid pOPIN-F-cSrc (Simard *et al.*, 2009) lại cho biểu hiện cSrc không ổn định qua các điều kiện bảo quản trên; 2 - 3 khuẩn lạc trong 5 khuẩn lạc không biểu hiện cSrc để có thể tinh chế được. Kết quả này chứng tỏ các dòng *B. subtilis* có mang plasmid pHT1087 cho phép protein cSrc dung hợp biểu hiện ổn định trong các điều kiện bảo quản.



Hình 1. Kiểm tra khả năng biểu hiện và tinh chế cSrc bằng điện di SDS-PAGE. A. Khảo sát sự biểu hiện protein cSrc; T. Protein tổng số của tế bào; S. Mẫu protein hòa tan thu nhận được sau khi loại bỏ tủa; His. Protein được bắt lại trên các hạt Ni-NTA; B. SDS-PAGE thể hiện các mẫu protein trong quá trình tinh chế; M. Thang protein chuẩn; S. Mẫu protein hòa tan trước khi nạp vào cột; His. Một phần đoạn của mẫu protein được dung ly sau khi bám lên cột HisTrap; TEV. Mẫu His được cắt bằng TEV; non His. Phần đoạn không bám lên cột HisTrap sau khi cho mẫu TEV qua cột; Ani. Mẫu thu nhận được sau khi tinh chế từ cột HiTrap Q FF.

Tinh sạch protein và đánh dấu huỳnh quang

Tế bào *B. subtilis* thu nhận sau khi cảm ứng biểu hiện được phá vỡ thành tế bào, ly tâm loại bỏ các mảnh vỡ của tế bào cũng như các protein không tan, thu nhận phần đoạn protein hòa tan (Hình 1B, giếng S). Nạp phần đoạn protein hòa tan lên cột HisTrap HP gắn với máy FPLC. Protein được dung ly theo quy trình độ tăng dần của imidazole; các phần đoạn có chứa protein dung hợp được gom lại (Hình 1B, giếng His) và thực hiện phản ứng cắt bằng TEV trong túi thẩm tích nhằm làm giảm lượng imidazole trong mẫu. Sản phẩm cắt (Hình 1B, giếng TEV) được nạp lại qua cột HisTrap; các phần đoạn protein đi qua cột sẽ chứa cSrc (Hình 1B, giếng non His) vì đuôi His đã bị cắt bỏ. Nhằm làm sạch hơn, các phần đoạn protein được nạp qua cột HiTrap Q FF và protein được dung ly theo nồng độ tăng dần của NaCl. Các phần đoạn sau khi tinh sạch được gom lại và bảo quản. Kết quả

cho thấy protein cSrc khá tinh sạch trên SDS-PAGE (Hình 1B, giếng Ani) và có thể sử dụng cho các bước kế tiếp. Mẫu protein này được sử dụng để đo khối lượng phân tử bằng LC-ESI-MS. Kết quả đo được sau khi deconvolution bằng chương trình MagTran với peak chính là 31368 Da (Hình 2A), tương thích với khối lượng phân tử cSrc theo lý thuyết là 31362 Da.

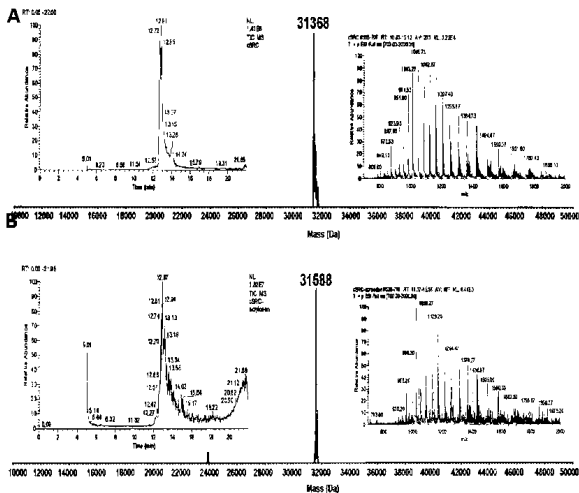
Kinase cSrc được tinh sạch có mang ba đột biến chuyển cysteine thành serine, C277S, C483S, C496S nhằm tránh việc đánh dấu ở các vị trí không mong muốn và một đột biến chuyển leucine thành cysteine, L407C. Đột biến L407C, nằm ngay sau motif DFG là vị trí acrylodan sẽ được gắn vào. Khi acrylodan gắn vào ở vị trí này có thể giúp cho việc phát hiện các thay đổi nhỏ trong cấu trúc của protein khi có một phân tử bám vào. Protein được đánh dấu như được mô tả trong phần vật liệu và

phương pháp. Sau khi đánh dấu, cSrc-acrylodon được đo khối lượng phân tử bằng LC-MS và deconvolution bằng chương trình MagTran. Kết quả cho thấy, peak chính có khối lượng phân tử là 31588 Da tương ứng với khối lượng phân tử là 31587 Da. Từ các kết quả này, chúng tôi có thể kết luận rằng protein kinase cSrc được biểu hiện từ *B. subtilis* và protein được đánh dấu có kết quả đúng như dự đoán.

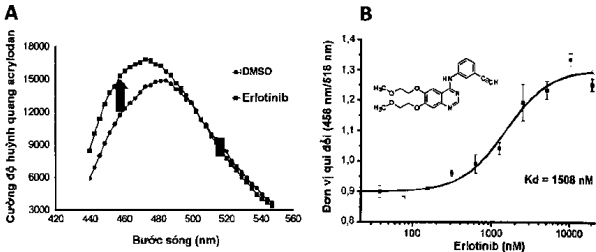
Kiểm tra khả năng sử dụng protein được đánh dấu để sàng lọc

Sau khi có được protein đánh dấu chúng tôi tiến hành kiểm tra khả năng sử dụng để sàng lọc các chất bám vào nó. Đầu tiên, các chất như dasatinib và imatinib được sử dụng để khảo sát, các kết quả thu

nhận được về sự đáp ứng của protein này ở bước sóng 475 nm và 505 nm là tương tự như các kết quả thu nhận cho protein được tinh chế từ *E. coli* (Simard *et al.*, 2009). Sau đó chúng tôi tiến hành khảo sát thêm với erlotinib; đây là một chất đặc biệt bám vào FGFR kinase, tuy nhiên nó cũng có khả năng bám vào các kinase khác (Karaman *et al.*, 2008). Kết quả cho thấy khi có sự hiện diện của erlotinib đã làm thay đổi cường độ huỳnh quang của acrylodon (Hình 3A). Các bước sóng chọn để tính toán có thể sử dụng từ khoảng 458 nm – 480 nm chia cho 500 nm – 520 nm; Kd (dissociation constant) vẫn không thay đổi đáng kể khi chọn bước sóng trong khoảng này để tính (Hình 3B). Như vậy, protein cSrc thu nhận từ *B. subtilis* cũng có cùng đặc tính như từ *E. coli* và có thể dùng trong sàng lọc các chất bám vào kinase cSrc.



Hình 2. Khối lượng phân tử của protein cSrc và cSrc-acrylodon. A. Khối lượng phân tử của mẫu protein cSrc không có đánh dấu acrylodon. Protein cSrc có khối lượng phân tử lý thuyết là 31362 Da và kết quả thực tế sau khi deconvolution bằng chương trình MagTran với peak chính là 31368 Da; B. Khối lượng phân tử của cSrc-acrylodon. cSrc-acrylodon có khối lượng phân tử lý thuyết là 31587 Da và kết quả thực tế sau khi deconvolution bằng chương trình MagTran với peak chính là 31588 Da.



Hình 3. Sự biến đổi cường độ huỳnh quang khi gắn với chất bám và ái lực của nó. A. Sự thay đổi cường độ huỳnh quang của protein được đánh dấu bởi acrylodan khi tương tác với Erlotinib so với đối chứng âm (DMSO); B. Sơ đồ thể hiện khả năng bám của Erlotinib lên cSrc thông qua Kd

KẾT LUẬN

Như vậy protein cSrc đã được biểu hiện ổn định trong *B. subtilis*. Protein cSrc sau khi tinh sạch đã được đánh dấu bằng chất phát huỳnh quang acrylodan và có thể dùng trong việc sàng lọc nhanh các chất có khả năng bám vào cSrc kinase phục vụ cho việc thăm dò các chất ức chế các tế bào khối u.

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

- Dehm SM, Bonham K (2004) SRC gene expression in human cancer: the role of transcriptional activation. *Biochem Cell Biol* 82: 263–274.
- Karaman MW, Herrgard S, Treiber DK, Gallant P, Atteridge CE, Campbell BT *et al.* (2008) A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol* 26: 127–132.
- Nada S, Okada M, MacAuley A, Cooper JA, Nakagawa H (1991) Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src. *Nature* 351: 69–72.
- Nguyen HD, Phan TTP, Schumann W (2007) Expression vectors for the rapid purification of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol* 55: 89–93.
- Okada M, Nakagawa H (1989) A protein tyrosine kinase involved in regulation of pp60c-src function. *J Biol Chem* 264: 20886–20893.
- Phan TTP, Nguyen HD, Schumann W (2006) Novel plasmid-based expression vectors for intra- and extracellular production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Prot Expr Purif* 46: 189–195.
- Phan TTP, Nguyen HD, Schumann W (2010) Establishment of a simple and rapid method to screen for strong promoters in *Bacillus subtilis*. *Prot Expr Purif* 71: 174–178.
- 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.
- Simard JR, Klüter S, Grütter C, Getlik M, Rabiller M, Rode HB, *et al.* (2009) A new screening assay for allosteric inhibitors of cSrc. *Nat Chem Biol* 5: 394–396.
- Titok MA, Chapus J, Selezneva YV, Lagodich AV, Prokulevich VA, Ehrlich SD, *et al.* (2003) *Bacillus subtilis* soil isolates: plasmid analysis and construction of a new theta-replicating vector. *Plasmid* 49: 53–62.
- Wheeler DL, Iida M, Dunn EF (2009) The Role of Src in Solid Tumors. *Oncologist* 14: 667–678.

<http://magtran.software.informer.com>.

EXPRESSION OF cSrc IN *BACILLUS SUBTILIS* AND PURIFICATION FOR SCREENING ITS BINDERS BY USING FLiK METHOD

Phan Thi Phuong Trang, Nguyen Duc Hoang

University of Science, VNU-HCMC

SUMMARY

cSrc tyrosine kinase is a non-receptor tyrosine kinase protein that is encoded by the *SRC* gene. This gene is similar to the oncogene *SRC* gene of Rous sarcoma virus, encoding for vSrc. cSrc activation has been observed in about of 50% of tumors derived from the colon, liver, lung, breast, and pancreas. Screening small molecules that bind to cSrc is important in development of drug that inhibits the growth of the tumors. FLiK (Fluorescence Label in Kinase) method has been developed recently allowing to screening the binders that bind to in or outside ATP pocket of kinase. The cSrc kinase domain for FLiK was expressed in *Escherichia coli*, but the expression was unstable after keeping the strain in a fridge or deep freezer for a certain period. In this report, we presented the expression of cSrc kinase domain in *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) and purification using affinity chromatography. The expression of this protein was stable in *B. subtilis* using the strain recovered from a deep freezer. Purified kinase was then labelled by a fluorescence molecule, acrylodan. The molecular mass was identified by LC-ESI-MS (liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry). The labelled kinase exhibited the ability to use for screening its binders.

Keywords: *Bacillus subtilis*, plasmid pHT, cSrc kinase, FLiK