

Phát triển vector biểu hiện mang promoter *Pgrac100* được cảm ứng bởi IPTG và sáp nhập gen *gfp+* vào bộ gen vi khuẩn *Bacillus subtilis* tại locus *lacA*

Chu Thị Bích Phượng^{1,2,3}, Nguyễn Đức Hoàng^{1,2}, Phan Thị Phượng Trang^{1,2,4*}

¹Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, phường 4, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, phường Linh Trung, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Khoa Dược, Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh, 475A Điện Biên Phủ, phường 25, quận Bình Thạnh, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁴Phòng Thí nghiệm Công nghệ Sinh học Phân tử, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, phường Linh Trung, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 1/6/2023; ngày chuyển phân biện 3/6/2023; ngày nhận phân biện 24/6/2023; ngày chấp nhận đăng 30/6/2023

Tóm tắt:

Bacillus subtilis là một loại vi khuẩn gram dương có nhiều đặc điểm thuận lợi trong sản xuất protein tái tổ hợp ở các lĩnh vực công nghiệp, nông nghiệp, y dược và thực phẩm. Nghiên cứu được thực hiện nhằm phát triển hệ thống biểu hiện cảm ứng chứa promoter *Pgrac100* được sáp nhập tại vị trí *lacA* trong bộ gen của vi khuẩn *B. subtilis*. Kết quả cho thấy, promoter *Pgrac100* có thể kiểm soát chặt chẽ sự biểu hiện protein mục tiêu trong hệ thống sáp nhập với tỷ lệ cảm ứng lần lượt đạt 3,3, 7,6 và 10,8 sau 4 giờ nuôi cấy với chất cảm ứng biểu hiện protein (Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside - IPTG) ở các nồng độ 0,01, 0,1 và 1,0 mM. Thời gian cảm ứng và nồng độ IPTG có ảnh hưởng quan trọng đến hiệu quả biểu hiện protein mục tiêu. Sau 4 giờ nuôi cấy cảm ứng với 0,1 mM IPTG, chủng *B. subtilis* sáp nhập mang promoter *Pgrac100* cho hiệu quả biểu hiện protein cao nhất với lượng GFP chiếm 13% protein tổng số tế bào. Hệ thống vector sáp nhập chứa promoter *Pgrac100* có tiềm năng ứng dụng trong nghiên cứu cơ bản và sản xuất công nghiệp.

Từ khoá: *Bacillus subtilis*, *lacA*, *Pgrac100*, sáp nhập, vector cảm ứng IPTG.

Chỉ số phân loại: 2.8

1. Mở đầu

B. subtilis là loài vi khuẩn tiềm năng được sử dụng làm tế bào chủ trong sản xuất protein tái tổ hợp ở các lĩnh vực công nghiệp, nông nghiệp, y dược và thực phẩm [1]. Với tiềm năng ứng dụng lớn, hệ thống biểu hiện cho *B. subtilis* với các loại promoter dùng các chất cảm ứng khác nhau đã được nghiên cứu. Trong đó, chiến lược phát triển vector sáp nhập ra đời nhằm giải quyết vấn đề của vector sao chép độc lập như sự bất ổn trong cấu trúc vector hay sự lan truyền của các gen kháng kháng sinh [2, 3]. Tuy nhiên, chiến lược này còn gặp khó khăn do số lượng bản sao của gen mục tiêu trong tế bào giảm sau khi sáp nhập vào bộ gen của chủng chủ làm mức độ biểu hiện protein giảm [3, 4]. Do vậy, các promoter mạnh được định hướng sử dụng trong các hệ thống vector sáp nhập nhằm tăng cường biểu hiện protein mục tiêu. *Pgrac100* là một promoter mạnh được cải tiến từ promoter *Pgrac01* cho phép biểu hiện vượt mức protein ứng dụng trong sản xuất công nghiệp. Nghiên cứu trước đây đã

chứng minh *Pgrac100* trong hệ thống plasmid độc lập có thể biểu hiện protein BgaB trong tế bào *B. subtilis* lên đến 30% protein tổng số của tế bào [5]. Locus *lacA* là locus tiềm năng được sử dụng phổ biến để sáp nhập gen ngoại lai vào DNA bộ gen do mã hóa protein không thiết yếu cho tế bào vi khuẩn [2].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thiết kế vector cảm ứng mang promoter *Pgrac100* có khả năng sáp nhập vào vị trí *lacA* của vi khuẩn *B. subtilis* và đánh giá khả năng điều hòa biểu hiện protein của chủng sáp nhập thông qua protein chỉ thị GFP.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Chủng vi sinh vật, plasmid và điều kiện nuôi cấy

Các chủng vi sinh vật, plasmid và các trình tự oligonucleotide sử dụng trong nghiên cứu được trình bày ở bảng 1.

*Tác giả liên hệ: Email: tptrang@hemus.edu.vn

Development of expression vector with the *Pgrac100* promoter induced by IPTG and integrated *gfp+* gene into *Bacillus subtilis* genome at *lacA* locus

Thi Bich Phuong Chu^{1,2,3}, Duc Hoang Nguyen^{1,2},
Thi Phuong Trang Phan^{1,2,4*}

¹Center for Bioscience and Biotechnology,

University of Science, Vietnam National University - Ho Chi Minh City,
227 Nguyen Van Cu Street, Ward 4, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Vietnam National University - Ho Chi Minh City,

Linh Trung Ward, Thu Duc City, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Faculty of Pharmacy, Ho Chi Minh City University of Technology,

475A Dien Bien Phu Street, Ward 25, Binh Thanh District, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁴Laboratory of Molecular Biotechnology,

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

Linh Trung Ward, Thu Duc City, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 1 June 2023; revised 24 June 2023; accepted 30 June 2023

Abstracts:

Bacillus subtilis is a prospective gram - positive bacterium that offers an opportunity for the production of recombinant proteins in the pharmaceutical, agricultural, industrial, and food industries. The goal of this study was to develop an integrative inducible expression system by incorporating the *Pgrac100* promoter into the *lacA* locus of the *B. subtilis* genome. The results showed that the *Pgrac100* promoter was able to strictly control the expression of the target protein, with induction factors of 3.3, 7.6, and 10.8 after 4 hours under induction with 0.01, 0.1, and 1 mM Isopropulβ-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), respectively. The duration of induction and the concentration of IPTG had significant effects on the efficacy of target protein expression. Specifically, when induced with 0.1 mM IPTG after 4 hours, there was a significant rise in GFP expression, accounting for 13% of the total cellular protein. Our new vector system provided more options for the production of recombinant proteins in basic research and industrial applications.

Keywords: *Bacillus subtilis*, integrative, Isopropulβ-D-1-thiogalactopyranoside-inducible vector, *lacA* locus, *Pgrac100*.

Classification number: 2.8

Bảng 1. Danh sách các chủng vi khuẩn, plasmid và oligonucleotide được sử dụng.

Chủng vi khuẩn	Nguồn/tài liệu tham khảo	Ghi chú
<i>E. coli</i> OmniMAX	Invitrogen	Đông hoá plasmid
<i>B. subtilis</i> 1012	[6]	Tạo chủng sáp nhập
pHT01	[7]	Chủng đối chứng âm
pHT10- <i>gfp</i> ⁺	[7]	Chủng đối chứng dương
HT2095	Tạo ra trong nghiên cứu này	Chủng <i>B. subtilis</i> sáp nhập tại vị trí <i>lacA</i>
Tên plasmid	Nguồn/tài liệu tham khảo	Ghi chú
pHT01	[7]	Đối chứng âm
pHT10- <i>gfp</i> ⁺	[7]	Đối chứng dương
pHT1399	Từ bộ sưu tập của các tác giả	Vector khung, sáp nhập tại vị trí <i>lacA</i>
pHT2095	Tạo ra trong nghiên cứu này	Vector sáp nhập tại vị trí <i>lacA</i> , mang gen <i>gfp</i> ⁺
Oligonucleotide	Mục đích sử dụng	
ON1354	PCR khuôn lạc	
ON1277	PCR khuôn lạc và nhân bản gen <i>gfp</i> ⁺	
ON1280	Nhân bản gen <i>gfp</i> ⁺	
ON562	Kiểm tra gen <i>gfp</i> ⁺ trong chủng sáp nhập	
ON384		
ON1442	Kiểm tra gen sáp nhập ở vị trí 3' <i>lacA</i>	
ON945		
ON946	Kiểm tra gen sáp nhập ở vị trí 5' <i>lacA</i>	
ON1441		

2.2. Đông hoá vector pHT2095 chứa promoter *Pgrac100* có khả năng sáp nhập tại vị trí *lacA* của vi khuẩn *B. subtilis*

Vector pHT2095 được tạo ra bằng cách nối gen *gfp*⁺ vào vector khung sườn pHT1399 tại vị trí cắt *Bam*HI/*Aat*III. Gen *gfp*⁺ được thu nhận bằng phản ứng PCR sử dụng khuôn từ plasmid pHT10-*gfp*⁺ [7] với cặp mồi ON1277-ON1280. Sản phẩm nối có chứa vector pHT2095 được biến nạp vào chủng *E. coli* OmniMAX, sàng lọc trên môi trường có bổ sung kháng sinh ampicillin (100 µg/ml) và PCR khuôn lạc với cặp mồi ON1277-ON1354. Khuẩn lạc cho kết quả dương tính được nuôi cấy, tách chiết bằng bộ kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific) và trình tự gen được giải theo phương pháp Sanger cải tiến.

2.3. Tạo chủng *B. subtilis* sáp nhập

Vector pHT2095 được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *B. subtilis* 1012 để tạo chủng sáp nhập HT2095. Vi khuẩn được nuôi cấy ở 37°C trong 10 ml môi trường LB chứa kháng sinh neomycin (10 µg/ml) và 100 µl ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) 0,1 M và lắc 50 vòng/phút trong 2 giờ. Thêm 10 µg vector pHT2095 vào và nuôi cấy lắc ở 200 vòng/phút ở 37°C trong 2 giờ. Vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường rắn LB có bổ sung kháng sinh neomycin (10 µg/ml) và ủ qua đêm ở 37°C. Các khuẩn lạc đặc trưng cho *B. subtilis* được chọn để thực hiện PCR khuẩn lạc với 3 cặp mồi ON1442-ON945; ON562-ON384; ON946-ON1441 để kiểm tra sự sáp nhập.

2.4. Biểu hiện protein GFP của chủng *B. subtilis* sáp nhập

Vi khuẩn *B. subtilis* được nuôi cấy ở 37°C trên môi trường rắn LB có bổ sung neomycine (10 µg/ml) và IPTG ở các nồng độ khác nhau (0, 0,1 và 1 mM). Sau 12 giờ, khả năng biểu hiện GFP của khuẩn lạc được đánh giá thông qua sự phát sáng dưới tia UV ở bước sóng 320 nm.

Vi khuẩn *B. subtilis* được nuôi cấy ở 37°C trong môi trường lỏng LB có bổ sung kháng sinh neomycine (10 µg/ml) và IPTG ở các nồng độ khác nhau từ 0 đến 2,0 mM. Thu mẫu ở các thời điểm 0 giờ - trước cảm ứng và 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 và 24 giờ - sau cảm ứng, sinh khối tế bào được thu nhận để kiểm tra sự biểu hiện protein GFP bằng cách đo huỳnh quang ở bước sóng 470 nm. Sinh khối tế bào được huyền phù trong 500 µl dung dịch đệm PBS (25 mM SDS, 250 mM sucrose) chứa 200 µg/ml lysozyme và ủ ở 37°C trong 30 phút. Ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 5 phút và thu dịch nổi. Hút 50 µl dịch nổi vào đĩa NuncTM 384 để đo hoạt tính GFP bằng máy đọc đĩa CLARIOstar Plus - BMG LabTech ở bước sóng kích thích 470±8 nm và bước sóng phát quang 515±8 nm. Hoạt tính phát quang của GFP được tính theo công thức: $dGFP/OD_{600}$. Trong đó, $dGFP$: đơn vị huỳnh quang tương đối của mẫu (RFU - The relative fluorescent unit) và OD_{600} : mật độ quang học của mẫu [8]. Bên cạnh đó, mức độ biểu hiện GFP trong tổng số protein tế bào được xác định bằng kỹ thuật điện di SDS-PAGE [9] và tính toán bằng phần mềm AlphaEaseFC 4.0.

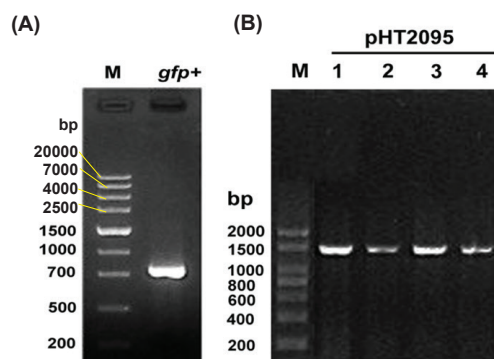
2.5. Phương pháp thống kê

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần trong cùng điều kiện. Đơn vị hoạt tính GFP của từng mẫu được biểu thị dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn của đơn vị huỳnh quang tương đối (RFU) từ 3 thí nghiệm. Sử dụng phần mềm Excel để tính toán và xử lý số liệu thu được.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Dòng hóa vector pHT2095 chứa promoter *Pgrac100* có khả năng sáp nhập tại vị trí *lacA* của vi khuẩn *B. subtilis*

Gen mục tiêu *gfp+* được thu nhận bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu ON1277-ON1280 từ khuôn pHT10-*gfp+* mang trình tự nhận biết của 2 enzyme cắt giới hạn *Bam*HI và *Aat*II. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 2%, kết quả cho thấy có 1 vạch sáng có kích thước tương ứng với kích thước lý thuyết là 748 bp (hình 1A). Như vậy, gen mục tiêu đã được thu nhận thành công. Sản phẩm PCR được nối vào plasmid khung sườn pHT1399 tại vị trí *Bam*HI và *Aat*II. Chủng *E. coli* OmniMAX chứa plasmid tái tổ hợp pHT2095 phát triển được trên môi trường LB chứa kháng sinh ampicillin (100 mg/ml) được kiểm tra bằng PCR khuẩn lạc. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy, cả 4 khuẩn lạc *E. coli* được chọn để sàng lọc đều xuất hiện vạch sáng với kích thước đúng như lý thuyết là 1417 bp (hình 1B). Khuẩn lạc số 1 được chọn để tách plasmid và giải trình tự bởi Công ty Macrogen. Inc (Hàn Quốc). Kết quả cho thấy có sự tương đồng 100% của vector dòng hóa so với trình tự lý thuyết (kết quả không trình bày ở đây). Có thể kết luận đã tạo dòng thành công vector tái tổ hợp pHT2095 mang promoter *Pgrac100* với gen chỉ thị *gfp+*.

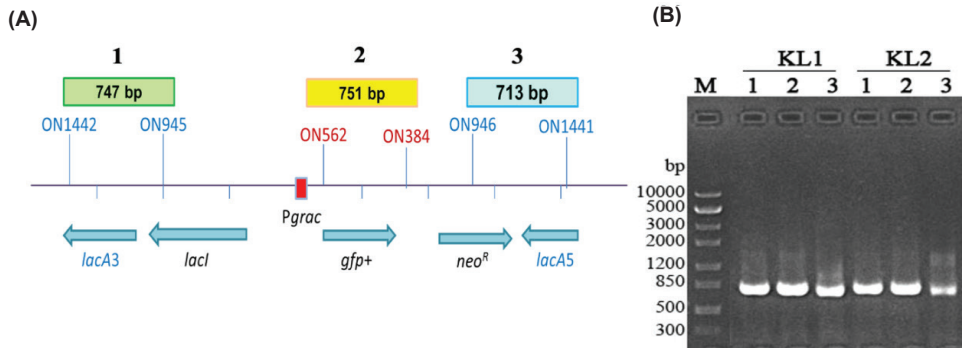


Hình 1. Điện di trên gel agarose 2%. (A) Sản phẩm PCR nhân bản gen *gfp+* (748 bp); **(B)** Sản phẩm PCR từ 4 khuẩn lạc (1417 bp). M: thang DNA chuẩn; 1, 2, 3, 4: mã khuẩn lạc.

3.2. Tạo vi khuẩn *B. subtilis* sáp nhập chứa vector pHT2095

Plasmid pHT2095 được biến nạp vào tế bào *B. subtilis* 1012 bằng phương pháp biến nạp tự nhiên. Các khuẩn lạc *B. subtilis* có mang vector tái tổ hợp đã được sáp nhập vào bộ gen được đặt tên là HT2095. Vi khuẩn sáp nhập có khả năng phát triển trên đĩa môi trường chứa kháng sinh neomycin. Phương pháp PCR khuẩn lạc sử dụng 3 cặp mồi đặc hiệu để kiểm tra sự sáp nhập tại 2 vị trí của vi khuẩn tái tổ hợp và kiểm tra gen mục tiêu sáp nhập *gfp+* được thể hiện trên hình

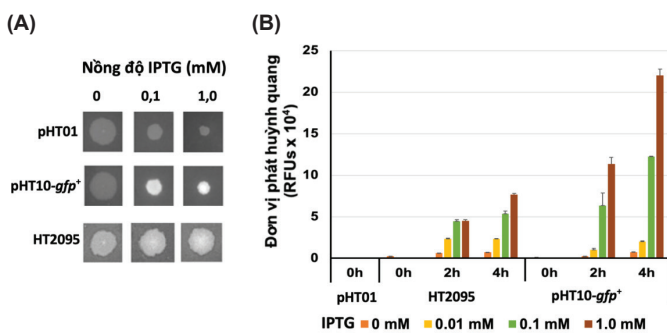
2A. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose cho thấy, cả 2 khuẩn lạc *B. subtilis* được chọn đều cho 3 vạch sáng (hình 2B), chứng tỏ có sự sáp nhập gen *gfp+* tại vùng 3' và 5' của locus *lacA*. Như vậy, chủng *B. subtilis* sáp nhập HT2095 đã được tạo thành công.



Hình 2. PCR khuẩn lạc *B. subtilis*. (A) Sơ đồ vị trí bắt cặp của mỗi; (B) Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose từ 2 khuẩn lạc được nuôi cấy. M: thang DNA chuẩn; KL1, KL2: khuẩn lạc 1, 2; 1, 2, 3: số thứ tự cặp môi sử dụng.

3.3. Biểu hiện protein GFP của chủng *B. subtilis* sáp nhập HT2095

Sự biểu hiện protein GFP của các chủng vi khuẩn được khảo sát trên môi trường rắn LB có bổ sung IPTG thông qua độ sáng của khuẩn lạc dưới tia UV. Kết quả khảo sát cho thấy, khuẩn lạc *B. subtilis* HT2095 có khả năng phát huỳnh quang tăng dần theo nồng độ IPTG cảm ứng từ 0 đến 1 mM, độ sáng mạnh nhất được ghi nhận ở nồng độ IPTG 1 mM. Chủng chứng dương pHT10-*gfp+* có khả năng phát sáng mạnh dưới điều kiện cảm ứng IPTG, trong khi chủng chứng âm pHT01 không có khả năng phát huỳnh quang (hình 3A). Điều này chứng tỏ độ sáng của khuẩn lạc là do GFP được biểu hiện ở các chủng *B. subtilis* tái tổ hợp mang gen *gfp+*. Như vậy, chủng HT2095 sáp nhập đã biểu hiện thành công protein mục tiêu GFP trên môi trường rắn.



Hình 3. Sự biểu hiện GFP của các chủng *B. subtilis* khảo sát. (A) Tín hiệu huỳnh quang trên môi trường rắn; (B) Hoạt tính GFP thu được trên môi trường lỏng.

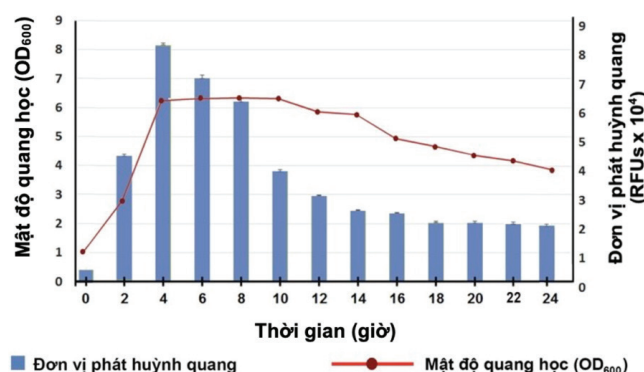
Kết quả đo hoạt tính GFP trong môi trường lỏng (hình 3B) phù hợp với kết quả khảo sát biểu hiện GFP trên môi trường rắn. Promoter *Pgrac100* sau khi sáp nhập vào bộ gen *B. subtilis* có thể kiểm soát chặt chẽ sự biểu hiện protein mục tiêu, thể hiện qua sự tăng tín hiệu huỳnh quang đáng

kể ở chủng khảo sát HT2095 khi tăng nồng độ chất cảm ứng IPTG từ 0 đến 1 mM. Khi cảm ứng với các nồng độ IPTG khác nhau (0, 0,01, 0,1 và 1 mM) thì tỷ lệ cảm ứng của chủng HT2095 thu được lần lượt là 3,8, 6,5, 8,2 sau 2 giờ và 3,3, 7,6 và 10,8 sau 4 giờ. Kết quả này thấp hơn so với chủng đối chứng pHT10-*gfp+* chứa plasmid độc lập với tỷ lệ cảm ứng lần lượt là 4,03, 25,4 và 45,6 ở thời điểm 2 giờ và 2,8, 17,2 và 31,1 ở thời

điểm 4 giờ so với mẫu không cảm ứng (hình 3B). Ngoài ra, mức độ phát huỳnh quang của chủng HT2095 thu được cao nhất ở thời điểm 4 giờ sau cảm ứng ở nồng độ IPTG 1 mM là $76,780 \pm 1,178$ RFUs, thấp hơn khoảng 3 lần khi so với chủng đối chứng dương pHT10-*gfp+* mang plasmid độc lập pHT10-*gfp+*. Như vậy, mặc dù promoter *Pgrac100* là promoter mạnh hơn *Pgrac01* 3 lần [5], nhưng khi sáp nhập vector chứa *Pgrac100* vào bộ gen của *B. subtilis* cho mức độ biểu hiện protein vẫn thấp hơn, điều này là do sự khác biệt về số lượng bản sao gen mục tiêu. Trong đó, tế bào chủ pHT10-*gfp+* chứa 4-6 bản sao của gen *gfp+* do plasmid độc lập pHT10-*gfp+* được thiết kế từ plasmid tự nhiên pBS72 và plasmid này tồn tại ổn định trong tế bào vi khuẩn *B. subtilis* với số lượng 4-6 bản sao [10]; còn chủng HT2095 chỉ có duy nhất một bản sao *gfp+* được sáp nhập vào bộ gen tại vị trí *lacA*. Sự tăng nồng độ IPTG thúc đẩy hoạt động của promoter nên hoạt động phiên mã tăng; lượng mRNA mã hóa cho protein mục tiêu tăng kéo theo sự tăng số lượng protein có hoạt tính. Khi lượng IPTG đã đáp ứng đủ cho hoạt động cảm ứng gen, dù có tăng thêm nồng độ chất cảm ứng thì cũng không làm tăng số lượng protein mục tiêu. Kết quả này phù hợp với cơ sở lý thuyết và nghiên cứu trước đây thực hiện trên các vector mang promoter *Pgrac01* và *Pgrac100* [5]. Như vậy, hệ thống vector sáp nhập cảm ứng IPTG pHT2095 có khả năng kiểm soát chặt chẽ sự biểu hiện protein mục tiêu trong vi khuẩn *B. subtilis*.

3.4. Ảnh hưởng của thời gian cảm ứng đến sự biểu hiện GFP của chủng *B. subtilis* HT2095

Trong thí nghiệm này, chủng *B. subtilis* HT2095 được nuôi cấy ở 37°C trong môi trường lỏng LB có bổ sung 1 mM IPTG. Sinh khối tế bào ở các thời điểm 0 giờ (trước cảm ứng) và 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 và 24 giờ (sau cảm ứng) được thu nhận để đo mức độ phát huỳnh quang (RFUs). Đồng thời, giá trị OD₆₀₀ của mẫu cấy ở thời điểm khác nhau cũng được ghi nhận để đánh giá ảnh hưởng của thời gian cảm ứng IPTG đối với sức sống của tế bào. Số liệu thể hiện ở hình 4 cho thấy, hoạt tính GFP của chủng khảo sát thay đổi theo thời gian cảm ứng. Từ thời điểm 0 giờ cho tới 4 giờ sau cảm ứng, hoạt tính của các mẫu có xu hướng tăng và đạt tối đa ở 4 giờ với hoạt tính gấp gần 22 lần so với trước khi cảm ứng. Tuy nhiên, khi tiếp tục kéo dài thời gian nuôi cấy từ 6 đến 24 giờ, hoạt tính GFP của các mẫu khảo sát giảm dần. Sự giảm hoạt tính này có thể liên quan đến mật độ tế bào và lượng protein biểu hiện. Do vi khuẩn *B. subtilis* biểu hiện GFP nội bào, khi mật độ tế bào tăng theo thời gian thì lượng GFP và mRNA mã hóa cho protein GFP cũng sẽ được nhân lên và chia cho thể hệ tế bào sau. Tuy nhiên, khi kéo dài thời gian nuôi cấy, lượng mRNA mã hóa cho GFP có thể bị phân rã dẫn đến sự sản xuất protein mục tiêu bị giảm theo thời gian nuôi cấy. Ngoài ra, kết quả OD₆₀₀ (hình 4) cũng cho thấy, ở thời điểm 4 giờ, vi khuẩn tái tổ hợp bắt đầu đã vượt qua pha log và bước

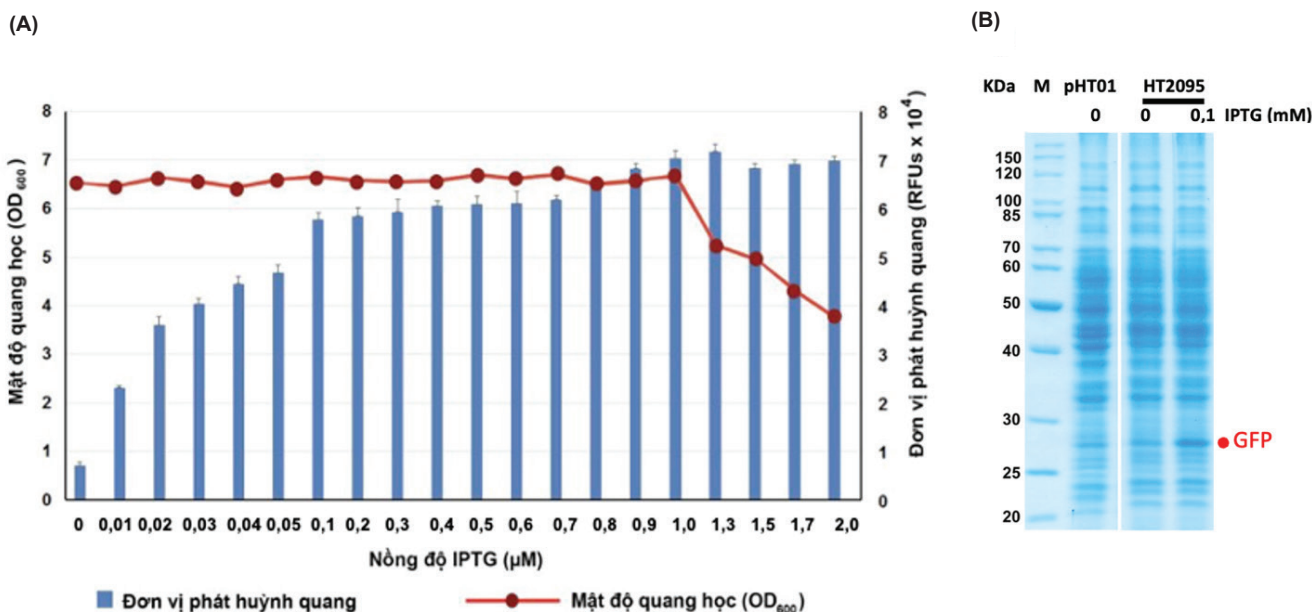


Hình 4. Sự sinh trưởng và sản xuất protein GFP của chủng *B. subtilis* HT2095 theo thời gian nuôi cấy.

vào đầu pha cân bằng. Đây là giai đoạn ổn định nhất của hệ nuôi cấy, số lượng tế bào đạt trạng thái cực đại và sức sống tế bào ở trạng thái tối ưu. Như vậy, thời gian cảm ứng tối ưu cho sự biểu hiện protein GFP trong môi trường lỏng của vi khuẩn *B. subtilis* cảm ứng sáp nhập HT2095 là 4 giờ. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của chúng tôi trước đó về ảnh hưởng của thời gian cảm ứng đối với sự sản xuất protein mục tiêu GFP trong vi khuẩn *B. subtilis* sáp nhập cảm ứng chứa promoter P_{grac212} [4].

3.5. Ảnh hưởng của nồng độ IPTG đến sự biểu hiện GFP của chủng *B. subtilis* HT2095

Trong thí nghiệm này, vi khuẩn *B. subtilis* HT2095 được nuôi cấy ở 37°C trong môi trường lỏng LB có bổ sung



Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ IPTG đối với chủng *B. subtilis* HT2095 nuôi cấy. (A) Sự sinh trưởng và sản xuất protein GFP trong điều kiện cảm ứng ở các nồng độ IPTG khác nhau; (B) Phân tích protein thu được từ chủng HT2095 khi cảm ứng với 0,1 mM IPTG bằng SDS-PAGE.

kháng sinh neomycine (10 µg/ml) và IPTG ở các nồng độ khác nhau từ 0 tới 2,0 mM. Kết quả trong hình 5A cho thấy, chủng *B. subtilis* HT2095 có xu hướng tăng mức độ biểu hiện GFP khi tăng nồng độ chất cảm ứng. Cụ thể, hoạt tính GFP thu được trong điều kiện cảm ứng 0,1 và 0,2 mM IPTG lần lượt cao gấp 7,5 và 8,5 lần so với điều kiện không cảm ứng (0 mM). Tuy nhiên, khi tiếp tục gia tăng nồng độ IPTG đến 1,0 mM thì giá trị GFP (RFUs) chỉ gấp 10 lần so với điều kiện không cảm ứng. Ở nồng độ IPTG lớn hơn 1,0 mM (1,3, 1,5, 1,7 và 2,0 mM) thì hoạt tính GFP và sức sống tế bào có sự suy giảm (hình 5A). Điều này có thể giải thích do IPTG là chất độc đối với tế bào vi khuẩn, nồng độ IPTG cao trong môi trường nuôi cấy có tác động xấu đến sức sống của tế bào [4, 11]. Sự biểu hiện protein GFP của chủng *B. subtilis* HT2095 sáp nhập mang promoter *Pgrac100* và gen mục tiêu *gfp+* đạt hiệu quả cao ở điều kiện cảm ứng với 0,1 mM IPTG sau 4 giờ nuôi cấy với lượng protein GFP chiếm 13% protein tổng số tế bào (hình 5B), kết quả này phù hợp với các nghiên cứu liên quan đến phát triển hệ thống sáp nhập mang promoter *Pgrac100* trước đó [3, 8]. Tương tự, hệ thống vector cảm ứng chứa promoter *Pgrac100* sáp nhập tại vị trí *amyE* có khả năng kiểm soát hiệu quả sự biểu hiện protein mục tiêu trong vi khuẩn *B. subtilis*, với lượng protein BgaB và GFP chiếm lần lượt 15 và 14% protein tổng số tế bào [4].

4. Kết luận

Hệ thống vector pHT2095 cảm ứng IPTG mang promoter *Pgrac100* được sáp nhập vào bộ gen của vi khuẩn *B. subtilis* tại vị trí *lacA* có khả năng kiểm soát chặt chẽ sự biểu hiện hiệu quả protein mục tiêu GFP trong tế bào ở các nồng độ IPTG khác nhau. Sau 4 giờ nuôi cấy cảm ứng trong môi trường LB lỏng với 0,1 mM IPTG, vi khuẩn *B. subtilis* sản xuất lượng GFP đạt 13% protein tổng số tế bào. Hệ thống vector sáp nhập có tiềm năng ứng dụng trong nghiên cứu cơ bản và sản xuất công nghiệp.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia Việt Nam (NAFOSTED) thông qua đề tài 106-NN.02-2015.24. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] L. Westers, H. Westers, W.J. Quax (2004), “*Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: A biotechnological approach to optimize the host organism”, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Mol. Cell. Res.*, **1694(1-3)**, pp.299-310, DOI: 10.1016/j.bbamcr.2004.02.011.
- [2] B. Härtl, W. Wehrl, T. Wiegert, et al. (2001), “Development of a new integration site within the *Bacillus subtilis* chromosome and construction of compatible expression cassettes”, *J. Bacteriol.*, **183(14)**, pp.2696-2699, DOI: 10.1128/JB.183.8.2696-2699.2001.
- [3] D.T.M. Tran, T.T.P. Phan, T.T.N. Doan, et al. (2020), “Integrative expression vectors with *Pgrac* promoters for inducer-free overproduction of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*”, *Biotechnol. Rep.*, **28**, DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00540.
- [4] P.T.B. Chu, T.T.P. Phan, T.T.T. Nguyen, et al. (2023), “Potent IPTG-inducible integrative expression vectors for production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*”, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **39(6)**, DOI: 10.1007/s11274-023-03566-8.
- [5] T.T.P. Phan, L.T. Tran, W. Schumann, et al. (2015), “Development of *Pgrac100*-based expression vectors allowing high protein production levels in *Bacillus subtilis* and relatively low basal expression in *Escherichia coli*”, *Microb. Cell Factories*, **14(72)**, DOI: 10.1186/s12934-015-0255-z.
- [6] H. Saito, T. Shibata, T. Ando (1979), “Mapping of genes determining nonpermissiveness and host-specific restriction to bacteriophages in *Bacillus subtilis* Marburg”, *Mol. Gen. Genet.*, **170(2)**, pp.117-122, DOI: 10.1007/BF00337785.
- [7] H.D. Nguyen, T.T.P. Phan, W. Schumann (2007), “Expression vectors for the rapid purification of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*”, *Curr. Microbiol.*, **55(2)**, pp.89-93, DOI: 10.1007/s00284-006-0419-5.
- [8] D.T.M. Tran, T.T.P. Phan, T.K. Huynh, et al. (2017), “Development of inducer-free expression plasmids based on IPTG-inducible promoters for *Bacillus subtilis*”, *Microb. Cell Factories*, **16(130)**, DOI: 10.1186/s12934-017-0747-0.
- [9] T. Phan, P. Huynh, T. Truong, et al. (2017), “A generic protocol for intracellular expression of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*”, *Heterologous Gene Expression in E. coli*, Springer, pp.325-334, DOI: 10.1007/978-1-4939-6887-9_21.
- [10] M.A. Titok, J. Chapuis, Y.V. Selezneva, et al. (2003), “*Bacillus subtilis* soil isolates: Plasmid replicon analysis and construction of a new theta-replicating vector”, *Plasmid*, **49(1)**, DOI: 10.1016/S0147-619X(02)00109-9.
- [11] P. Dvorak, L. Chrast, P.I. Nickel, et al. (2015), “Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway”, *Microb. Cell Factories*, **14**, DOI: 10.1186/s12934-015-0393-3.