

# KHẢO SÁT CÁC PROMOTER KIỂM SOÁT SỰ BIỂU HIỆN PROTEIN TRONG *BACILLUS SUBTILIS* VÀ *ESCHERICHIA COLI* SỬ DỤNG CHỈ THỊ $\beta$ -GALACTOSIDASE

Phan Thị Phương Trang<sup>1,2</sup>, Nguyễn Hoài Nam<sup>1,2</sup>, Trần Linh Thuộc<sup>1</sup>, Nguyễn Đức Hoàng<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh

## TÓM TẮT

*Escherichia coli* là vi sinh vật mô hình của vi khuẩn Gram âm, được sử dụng phổ biến để biểu hiện protein tái tổ hợp trong vài thập niên qua. *Bacillus subtilis* là vi sinh vật mô hình của vi khuẩn Gram dương, đang được quan tâm nghiên cứu sử dụng để biểu hiện protein tái tổ hợp trong những năm gần đây. Trong các nghiên cứu trước đó, chúng tôi đã tạo ra một thư viện với hơn 80 promoter xuất phát từ promoter mạnh, P<sub>grac</sub>, cho phép kiểm soát sự biểu hiện protein trong *B. subtilis* sử dụng chất cảm ứng IPTG. Trong báo cáo này, các promoter từ thư viện trên có khả năng kiểm soát sự biểu hiện protein trong cả hai chủng *E. coli* và *B. subtilis* được chọn lọc và khảo sát với gen chỉ thị *bgab* có nguồn gốc từ *Bacillus stearothermophilus*. Mức độ biểu hiện của protein chỉ thị  $\beta$ -galactosidase (Bgab) được đánh giá thông qua màu xanh của khuẩn lạc trên đĩa X-gal, SDS-PAGE và hoạt tính. Kết quả cho thấy, P<sub>grac100</sub> và P<sub>grac212</sub> cho mức độ biểu hiện tốt hơn so với P<sub>grac</sub> trong cả hai chủng *E. coli* và *B. subtilis*.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*,  $\beta$ -galactosidase, pHT01, P<sub>grac</sub>, P<sub>grac100</sub>, P<sub>grac212</sub>.

## MỞ ĐẦU

Để đạt hiệu quả cao trong sản xuất protein tái tổ hợp thì việc phát triển tế bào chủ và vector thích hợp giữ vai trò chủ đạo. Trong nhiều năm qua, hai loại tế bào chủ đại diện cho các nhóm vi sinh vật Gram âm và Gram dương là *Escherichia coli* và *Bacillus subtilis* đã được sử dụng như những chủng chủ đặc trưng nhờ số hữu các ưu điểm nổi bật. *E. coli* có những thuận lợi như thông tin di truyền được hiểu rõ, dễ dàng thao tác, có sẵn nhiều loại vector và các chủng đột biến có lợi, trong khi đó *B. subtilis* lại được biết đến như một vi sinh vật an toàn dùng cho thực phẩm, tiết kiệm các protein ra ngoài môi trường và khả năng lên men ở mật độ cao (Harwood, 1992; Schallmeier et al., 2004; Schumann, 2007). Chính vì vậy, việc sử dụng đồng thời *B. subtilis* và *E. coli* để tận dụng các ưu điểm của cả hai chủng chủ này là một hướng đang được quan tâm. Do đó, việc phát triển một hệ thống vector biểu hiện kép, sử dụng cùng một promoter, cho phép kiểm soát biểu hiện protein trong cả hai tế bào chủ *B. subtilis* và *E. coli* là cần thiết nhằm đạt hiệu quả cao trong nghiên cứu biểu hiện protein tái tổ hợp.

Promoter thường dùng để kiểm soát sự biểu hiện protein tái tổ hợp cho *B. subtilis* gồm ba dạng chính: (i) promoter cảm ứng sử dụng các chất cảm ứng đặc trưng ví dụ như IPTG và xylose; (ii) promoter cảm ứng theo pha tăng trưởng của vi sinh vật, tiêu biểu cho nhóm này là promoter của gene *aprE* và các biến thể của nó; (iii) các promoter tự cảm ứng. Trong số đó, promoter cảm ứng có ưu điểm vượt trội nhờ khả năng kiểm soát sự biểu hiện trong tất cả các pha tăng trưởng, cần phải kể đến là promoter P<sub>spac</sub> và promoter P<sub>grac</sub> (Phan et al., 2006). P<sub>grac</sub> là một promoter tổng hợp được tạo thành từ promoter P<sub>spac</sub> có nguồn gốc từ *B. subtilis* dung hợp với *lac* operator (*lacO*) của *E. coli* và sử dụng chất cảm ứng là IPTG. Promoter P<sub>grac</sub> mạnh hơn P<sub>spac</sub> 10 lần nên được quan tâm sử dụng cho sự biểu hiện vượt mức protein, có thể đạt mức 16% tổng số protein của tế bào (Phan et al., 2006). Hiện nay, plasmid với promoter P<sub>grac</sub> được sử dụng phổ biến nhất là pHT01 cùng với các biến thể của nó (Nguyen et al., 2007), được phân phối thông qua công ty Mobiltec (CHLB Đức). Một số nghiên cứu về promoter phụ thuộc  $\sigma^A$  ( $\sigma^A$ -dependent promoter) (Helmann 1995) của *B. subtilis* cho thấy một promoter mạnh thường có những đặc điểm sau: (i) trình tự khởi đầu phiên mã +1 thường là một purine; (ii) khoảng cách giữa vùng +1 và vùng -10 là 6 nucleotide; (iii) vùng -10 với trình tự TATAAT; (iv) một trình tự TRTG (R có thể là A hoặc G) từ vùng -17 đến -14, hay còn gọi là vùng -15; (v) vùng -35 mang trình tự TTGACA, (vi) khoảng cách giữa vùng -10 và -35 là 17 nucleotide và (vii) một vùng upstream giàu AT, được gọi là UP element (Aiyar et al. 1998). Dựa trên cơ sở này, chúng tôi tiến hành tối ưu hóa promoter P<sub>grac</sub> bằng cách thay đổi một hay kết hợp nhiều yếu tố nhằm tạo ra những promoter mạnh hơn với hiệu quả hoạt động cao hơn. Gần đây, chúng tôi đã tạo ra một thư viện có hơn 80 promoter chứa các biến thể của promoter P<sub>grac</sub> cho phép sàng lọc lựa chọn promoter phù hợp theo yêu cầu sử dụng (Phan et al., 2012, Phan et al., 2010). Các promoter của thư viện này được chia làm hai nhóm chính: (i) cải thiện độ mạnh của promoter thông qua việc thay đổi các nucleotide ở các vị trí bảo tồn như UP element, vùng -35, vùng -15, vùng -10 và vùng +1 (Phan et al., 2012); (ii) cải thiện độ bền của mRNA thông qua việc thay đổi trình tự nucleotide từ vùng +1 đến codon mở đầu (kết quả chưa công bố).

Trong báo cáo này, nhằm làm cơ sở cho việc phát triển hệ thống biểu hiện kép, chúng tôi tiến hành khảo sát việc kiểm soát sự biểu hiện của các promoter P<sub>grac</sub>, P<sub>grac100</sub> và P<sub>grac212</sub> được chọn lọc từ thư viện được thành lập ở trên. Plasmid với các promoter trên được khảo sát trong hai chủng *B. subtilis* 1012 và *E. coli* OmniMAX với chỉ thị Bgab nổi báo. Khả năng kiểm soát sự biểu hiện Bgab của các promoter trên được đánh giá dựa vào kết quả phân tích SDS-PAGE và hoạt tính enzyme chỉ thị của các chủng nuôi trong môi trường rắn và môi trường lỏng.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Chủng vi sinh vật, plasmid và môi trường nuôi cấy

*E. coli* OmniMAX (Invitrogen) và *B. subtilis* 1012 được dùng để đánh giá hệ thống biểu hiện kép trong thí nghiệm này. Các plasmid được sử dụng bao gồm pHT01-*bgab* (Nguyen et al., 2007), pHT100 (Phan et al., 2012), pHT212 (Hình 1A) có cấu trúc tương tự nhau, chỉ khác nhau ở vùng promoter là P<sub>grac</sub>, P<sub>grac100</sub> và P<sub>grac212</sub>. Gene chỉ thị *bgab* mã hóa

enzyme  $\beta$ -galactosidase được chèn vào cùng MCS nhằm đánh giá mức độ hoạt động của promoter. Thí nghiệm được thực hiện với đối chứng là pHT01. Môi trường được sử dụng trong các khảo sát là LB bao gồm NaCl (AR) 5 g, Tryptone water (Himedia, India) 10 g, Yeast Extract powder (Loba-Chemie, India) 5 g cho 1 L môi trường. Tế bào *E. coli* và *B. subtilis* được nuôi cấy lắc trên môi trường LB ở 37°C, kháng sinh được thêm vào với nồng độ tương ứng (ampicillin 100  $\mu$ g/ml đối với *E. coli* và chloramphenicol 10  $\mu$ g/ml đối với *B. subtilis*). Để đánh giá độ mạnh của promoter mới, cả hai loại tế bào chứa plasmid được trải trên môi trường thạch chứa X-gal nồng độ 2  $\mu$ g/ml để quan sát hoạt tính  $\beta$ -galactosidase.

**Khảo sát hoạt tính  $\beta$ -galactosidase trên môi trường rắn**

Các khuẩn lạc đơn chứa plasmid pHT01-*bgaB*, pHT100 và pHT212 được khảo sát hoạt tính BgaB nhằm sàng lọc những promoter mạnh trong cả hai chủng chủ *E. coli* và *B. subtilis*. Thí nghiệm được tiến hành trên đĩa LB chứa 2  $\mu$ g/ml X-gal và 4 nồng độ IPTG (0 mM; 0,001 mM; 0,01 mM; 0,1 mM) với 100  $\mu$ g/ml ampicillin (trường hợp *E. coli*) hoặc 10  $\mu$ g/ml chloramphenicol (trường hợp *B. subtilis*). Ủ trong 16 giờ ở 37°C và quan sát màu xanh của khuẩn lạc. Màu xanh của khuẩn lạc càng đậm tương đương lượng protein chỉ thị BgaB tạo ra càng nhiều, thủy phân X-gal thành 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo, một chất có màu xanh dương (Phan et al., 2010). Như vậy, độ đậm của màu xanh trên khuẩn lạc phản ánh độ mạnh của promoter. Hình ảnh được ghi nhận bằng máy chụp ảnh kỹ thuật số và được phân tích bằng phần mềm AlphaEaseFC để tính toán gray value (hay pixel value). Thực hiện tương tự với chủng âm là pHT01. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần trên 3 khuẩn lạc khác nhau.

**Cảm ứng biểu hiện BgaB**

Để đánh giá mức độ biểu hiện BgaB trước và sau khi cảm ứng, chúng tôi tiến hành nuôi cấy 2 chủng *E. coli* OmniMAX và *B. subtilis* 1012 chứa các plasmid pHT01-*bgaB*, pHT100, pHT212 trong môi trường LB với kháng sinh thích hợp ở 37°C và tốc độ lắc 180 vòng/phút. Thu mẫu 0 giờ khi OD<sub>600</sub> đạt 0,8 - 1 và bắt đầu cảm ứng IPTG tại thời điểm này với các nồng độ 0 mM, 0,001 mM, 0,01 mM, 0,1 mM, tiếp tục thu mẫu sau 2, 4, 6 giờ. Các mẫu được thu sao cho OD<sub>600</sub> đạt 1,2 đối với *E. coli* và 2,4 đối với *B. subtilis*. Sau đó ly tâm thu sinh khối và giữ mẫu ở -20°C. Đối với chủng mang plasmid chứng âm pHT01, chúng tôi tiến hành tương tự và thu mẫu ở thời điểm 4 giờ sau cảm ứng. 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**

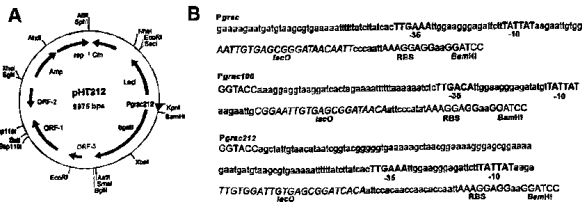
Mẫu sau khi thu ở các thời điểm sẽ được ly tâm (10000 vòng/phút ở 4°C trong 5 phút) và thu sinh khối. Hòa tan sinh khối trong 100  $\mu$ l lysis buffer, 25  $\mu$ l loading buffer 5X (0,135 M Tris/HCl, 30% glycerol, 3% SDS, 0,03% bromophenol blue, 0,15 M DTT) đối với tế bào *E. coli*; 100  $\mu$ l lysis buffer, 5  $\mu$ l lysozyme 50 mg/ml, ở 37°C trong 5 phút, sau đó thêm 30  $\mu$ l loading buffer 5X đối với tế bào *B. subtilis*. Mẫu sau khi xử lý sẽ được ủ ở 100°C trong 5 phút, ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút và thu dịch nổi tiến hành điện di SDS-PAGE. Đánh giá khả năng biểu hiện protein chỉ thị thông qua tỉ lệ BgaB trên protein tổng, sử dụng phần mềm AlphaEaseFC để tính toán.

**Khảo sát hoạt tính  $\beta$ -galactosidase trên môi trường lỏng**

Ở nhiệt độ 55°C,  $\beta$ -galactosidase có khả năng phân cắt ONPG (o-nitrophenol- $\beta$ -D-galactoside) tạo ONP (o-nitrophenol) có màu vàng và được hấp thụ tại bước sóng 420 nm (Phan et al., 2010). Mẫu tế bào *E. coli* OmniMAX và *B. subtilis* 1012 mang các plasmid cần khảo sát được nuôi cấy, cảm ứng và thu mẫu như đã mô tả ở phần trước. Hoạt tính  $\beta$ -galactosidase được xác định 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). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần trên 3 khuẩn lạc khác nhau.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

Vì *B. subtilis* và *E. coli* có sự tương đồng về bộ máy kiểm soát biểu hiện gene, nên các gene có biểu hiện tốt trên *B. subtilis* cũng có khả năng biểu hiện tốt trên *E. coli*.



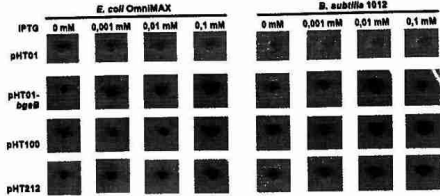
Hình 1. Sơ đồ của plasmid và trình tự các promoter. A, Sơ đồ plasmid pHT212; B, Trình tự của các promoter Pgrac, Pgrac100 và Pgrac212.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát đặc điểm của các promoter nhằm định hướng cho việc phát triển vector biểu hiện kép trên *B. subtilis* và *E. coli*, nhằm tận dụng ưu điểm của hai loại tế bào chủ này. Một trong những promoter đầu tiên được thiết kế cho các vector biểu hiện kép là Pgrac (Hình 1B). Với đặc điểm là một promoter nhân

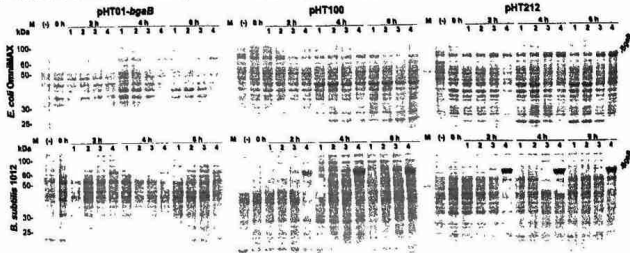
tạo, dung hợp từ promoter *groES* và trình tự điều hòa *lac operator*, cảm ứng bằng IPTG. Khi sử dụng các gene chỉ thị như *bgA*, *htpG*, *pbpE* chèn vào vùng downstream của *Pgrac*, lượng protein tái tổ hợp biểu hiện trong *B. subtilis* tương ứng là 10, 12 và 16% protein tổng (Phan *et al.*, 2006). Các promoter *Pgrac100* và *Pgrac212* được thiết kế nhằm chỉ tạo ra các sự đa dạng trong việc lựa chọn các promoter biểu hiện cao trong *B. subtilis*. Promoter *Pgrac100* nằm trong nhóm promoter được thay đổi ở vùng trước +1 nhằm tăng cường độ mạnh của promoter. Promoter *Pgrac100* được thay đổi vùng (UP, -35, -15) có trình tự như Hình 1B. Trong khi đó promoter *Pgrac212* nằm trong nhóm promoter được thay đổi từ vùng +1 đến codon khởi đầu nhằm tăng cường độ bền của mRNA được tạo ra sau khi phiên mã. Trình tự của *Pgrac212* (Hình 1B) với khoảng cách giữa cấu trúc kẹp tóc *lacO* và RBS (Ribosome binding site) được thay đổi thành 13 nucleotide so với *Pgrac* (5 nucleotide).

**Đánh giá độ mạnh của các promoter khi nuôi cấy chủng trên môi trường rắn**

Trong thí nghiệm này chúng tôi tiến hành khảo sát độ mạnh của promoter bằng cách quan sát mức độ biểu hiện của *BgaB* trên môi trường rắn. Khuẩn lạc đơn *E. coli* OmniMAX và *B. subtilis* 1012 mang plasmid pHT01-*bgaB*, pHT100 và pHT212 được chấm lên đĩa LB chứa X-gal với 4 nồng độ IPTG khác nhau, ủ 16 giờ ở 37°C. Thực hiện thí nghiệm đồng thời với mẫu chứng âm là tế bào *E. coli* OmniMAX và *B. subtilis* 1012 mang plasmid pHT01. Độ đậm của màu xanh trên khuẩn lạc phản ánh độ mạnh của promoter. Phương pháp này giúp sàng lọc nhanh những promoter mạnh. Tuy nhiên, vách tế bào *E. coli* và *B. subtilis* khác nhau về cấu trúc, do đó, mức độ màu xanh cũng khác nhau (Hình 2).



Hình 2. Khảo sát độ mạnh của các promoter thông qua hoạt tính của  $\beta$ -galactosidase trên môi trường rắn.



Hình 3. Kết quả điện di SDS-PAGE. Các mẫu tế bào được cảm ứng với 4 nồng độ IPTG 0 mM (1), 0,001 mM (2), 0,01 mM (3), 0,1 mM (4).

Với chủng chủ là *E. coli* OmniMAX, chúng tôi nhận thấy độ đậm của khuẩn lạc tăng dần theo nồng độ IPTG. Trong đó, các khuẩn lạc trên đĩa không bổ sung IPTG (0 mM) có sự phân biệt về độ đậm của màu xanh là rõ nhất (Hình 2, Trái, 0 mM), dựa vào nồng độ này (0 mM), chúng tôi nhận thấy khuẩn lạc có chứa plasmid pHT212 cho màu xanh đậm nhất, tiếp theo là pHT100 và nhạt nhất là pHT01-*bgaB*, còn đối với khuẩn lạc chứng âm mang plasmid pHT01 thì không có màu xanh. Bằng phần mềm AlphaEase, chúng tôi đánh giá độ đậm trên khuẩn lạc thông qua giá trị gray value. Kết quả cho thấy độ mạnh của promoter tăng dần theo thứ tự *Pgrac* < *Pgrac100* < *Pgrac212* khi sử dụng trên tế bào *E. coli* (số liệu không được trình bày). Kết quả này sẽ được nhận định chính xác hơn ở các thí nghiệm sau.

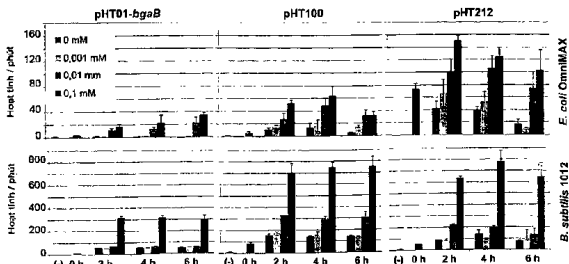
Thí nghiệm tương tự trên tế bào *B. subtilis* 1012, chúng tôi nhận thấy sự phân biệt độ đậm của khuẩn lạc rõ hơn ở các nồng độ IPTG cao, và rõ nhất tại 0,1 mM IPTG (Hình 2, Phải); do đó, chúng tôi sử dụng cơ sở nồng độ này để so sánh độ mạnh của promoter. Tương tự với *E. coli*, độ mạnh của promoter trên *B. subtilis* cũng tăng dần theo thứ tự *Pgrac* < *Pgrac100* < *Pgrac212*. Màu xanh không xuất hiện ở mẫu chứng âm pHT01. Trên các đĩa có nồng độ IPTG thấp hơn như ở nồng độ 0,001 mM, khuẩn lạc mang plasmid pHT100 có màu xanh đậm hơn cả. Điều này cho thấy promoter có khả năng biểu hiện tốt ở nồng độ IPTG thấp khi sử dụng chủng *B. subtilis* 1012. Như vậy, hai promoter pHT100 và *Pgrac100* và *Pgrac212* có khả năng hoạt động hiệu quả trên *E. coli* và *B. subtilis* cho mức độ biểu hiện protein chỉ thị cao hơn so với *Pgrac*.

**Đánh giá độ mạnh của promoter trong môi trường lỏng sử dụng SDS-PAGE**

Thí nghiệm này nhằm đánh giá độ mạnh của các promoter trong môi trường lỏng thông qua SDS-PAGE. Mẫu sử dụng trong thí nghiệm này được thu nhận như đã mô tả ở phần Vật liệu phương pháp. Toàn bộ protein nội bào sẽ được phân tách trên gel polyacrylamide 12%. Protein bắt màu với thuốc nhuộm Coomassie Blue cho vạch màu xanh trên gel. Quan sát kết quả sau khi giải nhuộm chúng tôi nhận thấy vạch có kích thước 78 kDa, tương ứng với kích thước của protein BgaB bắt đầu xuất hiện và tăng dần sau 2, 4, 6 giờ cảm ứng; mức độ biểu hiện của BgaB tăng theo nồng độ chất cảm ứng, cao nhất ở 0,1 mM IPTG ở cả hai chủng *E. coli* và *B. subtilis* (Hình 3). Sự chênh lệch về mức độ biểu hiện của protein chỉ thị rõ hơn trên *B. subtilis*, cụ thể ở các nồng độ IPTG thấp, mức độ biểu hiện không đáng kể nhưng tăng rất cao ở nồng độ 0,1 mM (Hình 3, Dưới); trong khi ở *E. coli*, kích thước và độ đậm của các vạch tương đương nhau, ngoại trừ plasmid pHT12 (Hình 3, Trên). Như vậy, sự kiểm soát biểu hiện trong *E. coli* là không chặt chẽ, bằng chứng là ở những nồng độ thấp, ngay cả khi không cảm ứng vẫn cho kết quả biểu hiện protein chỉ thị. Ngược lại, *B. subtilis* không biểu hiện khi không cảm ứng và mức độ biểu hiện ở 0,1 mM cao hơn *E. coli* rất nhiều. So sánh mức độ biểu hiện của 3 plasmid cần khảo sát, chúng tôi nhận thấy plasmid pHT01-bgaB biểu hiện yếu nhất trên cả 2 chủng *E. coli* và *B. subtilis*. Không giống như pHT01-bgaB, pHT100 tuy biểu hiện yếu trên *E. coli* OmniMAX, nhưng rất mạnh trong *B. subtilis* 1012, đạt 20% protein tổng. Tốt nhất là pHT212 với khả năng biểu hiện protein chỉ thị mạnh trong cả hai chủng; 24,4% trong *B. subtilis* và 23% trong *E. coli*. Dựa trên kết quả này, chúng tôi đưa ra kết luận, mức độ biểu hiện BgaB tăng dần theo thứ tự pHT01<pHT100<pHT212 ở cả hai chủng *E. coli* và *B. subtilis*, kết quả này tương ứng với kết quả ở thí nghiệm khảo sát trên môi trường rắn (Hình 2). Tuy nhiên, ở nồng độ 0,01 mM thì pHT100 lại cho mức độ biểu hiện tốt hơn trong *B. subtilis*, mặc dù sự khác biệt so với pHT212 là không nhiều. Như vậy, 2 promoter Pgrac100 và Pgrac212 đều cho khả năng sản xuất protein chỉ thị tốt hơn rất nhiều so với Pgrac trên cả hai chủng chủ, đặc biệt là trong *B. subtilis* (Hình 3).

**Đánh giá độ mạnh của promoter trong môi trường lỏng sử dụng phương pháp đo hoạt tính**

Để có thể đánh giá độ mạnh của promoter chính xác hơn, các promoter cần khảo sát sẽ được đánh giá thông qua hoạt tính BgaB ở 2, 4, 6 giờ sau khi cảm ứng bằng IPTG với các nồng độ như đã nêu ở phần Vật liệu phương pháp. ONP, sản phẩm có màu vàng, được tạo thành khi ONPG bị phân cắt bởi  $\beta$ -galactosidase, sự hấp thụ ánh sáng của ONP ở bước sóng 420 nm được sử dụng để khảo sát hoạt tính  $\beta$ -galactosidase (Phan et al., 2010). Độ mạnh của promoter được thể hiện thông qua độ đậm của màu vàng sau khi dừng phản ứng. Số liệu sau khi đo và xử lý được trình bày dưới dạng biểu đồ (Hình 4). Kết quả cho thấy, hai plasmid mới pHT100 và pHT212 cho hiệu quả hoạt động tốt trên cả 2 chủng *E. coli* (Hình 4, Trên) và *B. subtilis* (Hình 4, Dưới), với hoạt tính BgaB tăng cao hơn rất nhiều so với đối chứng pHT01-bgaB. Như vậy, việc điều chỉnh các trình tự UP, -35, -15 trong Pgrac100 và thay đổi khoảng cách 13 nucleotide giữa lacO và RBS trong Pgrac212 đã giúp tăng mức độ biểu hiện của protein chỉ thị, cụ thể là hoạt tính BgaB vượt hơn 2 lần so với Pgrac ở cả 2 chủng chủ. Tương tự với kết quả SDS-PAGE (Hình 3), mức độ biểu hiện protein chỉ thị tăng dần theo nồng độ chất cảm ứng và cao nhất ở nồng độ 0,1 mM. Hai promoter Pgrac100 và Pgrac212 cho kết quả biểu hiện protein tăng gấp 2 lần so với Pgrac và đạt cao nhất sau 4 giờ cảm ứng với 0,1 mM IPTG (Hình 4).



Hình 4. Đánh giá độ mạnh của promoter thông qua hoạt tính của  $\beta$ -galactosidase.

Với chỉ thị ứng dụng hệ thống biểu hiện kép vào sản xuất ở quy mô lớn thì việc giảm đến mức tối thiểu nồng độ chất cảm ứng là một tiêu chí khá quan trọng. Vì vậy, đây nồng độ IPTG mà chúng tôi khảo sát chỉ sử dụng cao nhất là 0,1 mM và kết quả cho thấy nồng độ IPTG thấp nhưng mức biểu hiện protein chỉ thị lại cao với cả hai promoter Pgrac100 và Pgrac212. Đặc biệt, ở *B. subtilis*, khả năng kiểm soát biểu hiện protein ở những nồng độ IPTG thấp hơn 0,1 mM khá tốt đối với Pgrac100, khi mà giá trị hoạt tính ở 0,01 mM IPTG cao hơn gấp 6 lần so với Pgrac và gấp 1,5 lần so với Pgrac212 (Hình 4, Dưới). Kết quả này đã trả lời được câu hỏi đặt ra trong các thí nghiệm trước, ở nồng độ IPTG thấp, Pgrac100 cho mức biểu hiện tốt hơn trong *B. subtilis* so với Pgrac212. Việc biểu hiện tốt ở nồng độ IPTG thấp của Pgrac100 cho mức biểu hiện tốt trong việc giảm thiểu lượng chất cảm ứng khi promoter này được vào ứng dụng để sản xuất protein với quy mô lớn. Trong khi đó, Pgrac212 lại cho khả năng biểu hiện tốt trong *E. coli* với hoạt tính gấp 5 lần so với Pgrac và 2 lần so với Pgrac100.

Kết quả cũng cho thấy mức độ biểu hiện nền khi không có chất cảm ứng khá cao, đặc biệt là với một promoter mạnh như Pgrac212 thì việc kiểm soát biểu hiện trong *E. coli* gặp nhiều khó khăn (Hình 4, *E. coli*, pHT212, mẫu 0 h). Điều này

gây nhiều bất lợi trong việc sử dụng plasmid ở bước dòng hóa, đặc biệt đối với các protein gây độc trên *E. coli*. Vấn đề này có thể được giải quyết bằng cách làm giảm số lượng bản sao plasmid trong *E. coli* với gene mã hóa cho Rop (repressor of primer) hoặc sử dụng trình tự mang các codon hiếm trong *E. coli*. Song, không phải lúc nào việc biểu hiện nên quá cao cũng mang lại những bất lợi, trong một số trường hợp, việc biểu hiện ở mức độ cao mà không cần chất cảm ứng lại cho thấy hiệu quả kinh tế rất cao khi sản xuất những protein không độc cho tế bào ở quy mô lớn. Còn nếu đối tượng làm việc là những protein độc cho tế bào thì việc sử dụng những promoter có mức độ kiểm soát biểu hiện hiệu quả như Pgrac lại là một lựa chọn phù hợp.

## KẾT LUẬN

Với mục đích cải tiến hệ thống vector biểu hiện kép cho *E. coli* và *B. subtilis*, chúng tôi đã đạt được kết quả như mong đợi khi chọn lọc và khảo sát hai promoter Pgrac100 và Pgrac212. Vùng UP element của Pgrac100 được điều chỉnh mang trình tự giàu AT, cùng với những thay đổi ở vùng -35 (TTGACA) và trình tự ATG trong vùng -15 (giúp thuận lợi cho phiên mã) đã cho thấy mức độ biểu hiện protein cao hơn Pgrac, với sự biểu hiện lên đến 20% protein tổng và hoạt tính BgaB cao gấp 2 lần ở cả hai chủng thí nghiệm. Bên cạnh đó, kết quả khảo sát biểu hiện từ Pgrac212 cho thấy mức độ biểu hiện BgaB đạt hơn 20% protein tổng ở cả 2 chủng chủ. Pgrac212 chứa trình tự cấu trúc kẹp tóc ở đầu 5' giúp làm bền mRNA cùng với việc tăng khoảng cách giữa cấu trúc kẹp tóc *lacO* và RBS lên 13 nucleotide cho phép tăng 5 lần hoạt tính BgaB ở *E. coli* và 2 lần ở *B. subtilis* so với Pgrac. Với các kết quả đạt được qua các thí nghiệm trên, chúng tôi có thể kết luận Pgrac100 và Pgrac212 là hai promoter mạnh với hiệu quả biểu hiện cao hơn gấp nhiều lần so với Pgrac cả trong *E. coli* và *B. subtilis*. Việc sử dụng hai promoter này để phát triển hệ thống biểu hiện kép có thể đạt được với tiềm năng cao.

## 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(25): 14652-14657
- Harwood CR (1992). *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends Biotechnol* 10(7): 247-256.
- Helmann JD (1995). Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* sigma A-dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. *Nucleic Acids Res* 23(13): 2351-2360.
- 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(1-2): 33-35.
- Nguyen HD, Phan TTP, Schumann W (2007). Expression vectors for the rapid purification of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol* 55(2): 89-93.
- 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(2): 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(1): 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(2): 174-178.
- Schallmeyer M, Singh A, Ward OP (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol* 50(1): 1-17.
- Schumann W (2007) Production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Adv Appl Microbiol* 62: 137-189.

## INVESTIGATION OF PROMOTERS PROTEIN EXPRESSION IN *BACILLUS SUBTILIS* AND *ESCHERICHIA COLI* BY USING $\beta$ -GALACTOSIDASE

Phan Thi Phuong Trang<sup>1,2</sup>, Nguyen Hoai Nam<sup>1,2</sup>, Tran Linh Thuoc<sup>1</sup>, Nguyen Duc Hoang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Biotechnology, University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City

<sup>2</sup>Center for Bioscience and Biotechnology, University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City

## SUMMARY

*Escherichia coli*, a model organism for Gram negative bacteria, is popularly exploited to express recombinant proteins in recent decades. *Bacillus subtilis*, a model organism for Gram positive bacteria, is used to study for over production of recombinant proteins for many years. In our previous study, we generated a library with more than 80 promoters derived from the strong promoter Pgrac which allows control protein expression in *B. subtilis* using IPTG. In this report, selected promoters ability to control protein expression in both *E. coli* and *B. subtilis* were investigated. The intracellular expression of a marker,  $\beta$ -galactosidase (BgaB) from *Bacillus stearothermophilus* was evaluated on the solid medium, liquid medium including SDS-PAGE and activity. Important characteristics of these promoters will be presented.

**Key words** *Bacillus subtilis*,  $\beta$ -galactosidase, pHT01, Pgrac, Pgrac100, Pgrac212.

\* Author for correspondence, ndhoang@hcmus.edu.vn