

BIỂU HIỆN VÀ TÍNH CHẾ CASEIN KINASE 1 (CK1D) CỦA NGƯỜI TRONG *BACILLUS SUBTILIS*

Nguyễn Đức Hoàng*, Phan Thị Phương Trang

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

TÓM TẮT

Bacillus subtilis đã được dùng để biểu hiện các protein dạng tiết dùng trong công nghiệp từ lâu, nhưng nghiên cứu sử dụng để biểu hiện vượt mức protein nội bào hướng đến thu nhận protein còn chưa được khám phá. Enzyme casein kinase (CK1D) có vai trò quan trọng trong nhịp sinh học ngày (circadian rhythm) và điều hòa sự vận chuyển eIF6 (eukaryotic translation initiation factor 6) ra khỏi nhân - một protein có vai trò quan trọng trong sinh tổng hợp tiểu phần 60S của ribosome tế bào nhân thực. Trong báo cáo này, chúng tôi sử dụng CK1D làm mô hình để biểu hiện và tính chế vùng hoạt tính của enzyme này trong *B. subtilis* sử dụng plasmid được phát triển bởi nhóm nghiên cứu trong những năm gần đây. Đầu tiên, gene mã hóa cho CK1D được dòng hóa vào một vector biểu hiện cho *B. subtilis*, trong đó CK1D được gắn với một đuôi dung hợp có mang His-tag. Kế đến, ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự biểu hiện dạng tan của CK1D dung hợp được khảo sát. Sau đó, CK1D tinh sạch không mang đuôi dung hợp được thu nhận thông qua các bước tinh chế khác nhau như sắc ký ái lực, cắt bỏ đuôi dung hợp, trao đổi ion. Khối lượng phân tử của CK1D được xác định lại bằng LC-MS. Kết quả cho thấy có thể sử dụng *B. subtilis* làm chủng chủ để biểu hiện protein tái tổ hợp và protein CK1D được tinh sạch có tiềm năng sử dụng trong các nghiên cứu sinh hóa và sinh lý khác.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, CK1D, pHT vector, Pgrac212.

MỞ ĐẦU

Protein kinase là một enzyme kinase có thể thay đổi một protein khác bằng cách gắn vào nó các nhóm phosphate. Sự phosphoryl hóa thường dẫn đến các thay đổi về chức năng của protein đích bằng cách thay đổi hoạt tính enzyme, vị trí trong tế bào, hoặc tương tác với các protein khác. Bộ gene người chứa khoảng 500 gene mã hóa cho các kinase và chiếm 2% các gene người. Có đến 30% các protein người có thể bị thay đổi bởi hoạt tính của các kinase và các kinase điều hòa phần lớn các con đường tế bào, đặc biệt có liên quan đến con đường truyền tín hiệu. Họ protein kinase CK1 người được mã hóa bởi bốn subunit (α , γ 1, γ 2, γ 3, δ , and ϵ) và điều hòa các quá trình sinh hóa khác nhau bao gồm đường truyền tín hiệu hedgehog, nhịp sinh học ngày (circadian rhythm), ức chế khối u có liên quan p53 (Cheong và Virshup, 2011). Họ CK1 của các kinase serine/threonine điều hòa các quá trình sinh hóa thông qua việc gắn vào và phosphoryl hóa các cơ chất protein. Trong số đó, CK1D (δ) có vai trò quan trọng trong nhịp sinh học ngày (Xu et al., 2005; Meng et al., 2010) và điều hòa sự vận chuyển eIF6 (eukaryotic translation initiation factor 6) ra khỏi nhân - một protein có vai trò quan trọng trong sinh tổng hợp tiểu phần 60S của ribosome tế bào nhân thực (Biswas et al., 2011). Với vai trò quan trọng như vậy, việc khảo sát các cách khác nhau để biểu hiện và tính chế các protein kinase một cách dễ dàng phục vụ cho các nghiên cứu các đặc tính sinh học, cấu trúc hay các phân tử ức chế nó là điều cần thiết.

Hệ thống biểu hiện protein ở *B. subtilis* hiện đang được quan tâm nghiên cứu và đã có một số hệ thống biểu hiện cho phép protein biểu hiện hiệu quả cao. Trong đó, hệ thống vector pHT đã được phân phối bởi công ty Mobitec (Đức), cho phép biểu hiện protein hiệu quả trong *B. subtilis*. Tiêu biểu cho nhóm vector pHT là pHT01 (Nguyễn et al., 2007) có mang promoter Pgrac, cho phép biểu hiện protein tái tổ hợp nội bào lên đến 16%. Nhằm cải thiện hệ thống biểu hiện này, một thư viện các promoter có nguồn gốc từ Pgrac được tạo ra bằng cách thay đổi một hay kết hợp nhiều yếu tố trên vùng bảo tồn nhằm tạo ra những promoter mạnh hơn với hiệu quả hoạt động cao hơn. Chúng tôi đã tạo ra một thư viện có hơn 80 promoter chứa các promoter của promoter Pgrac cho phép sàng lọc lựa chọn promoter phù hợp theo yêu cầu sử dụng (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 +1 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. Trong thư viện này, promoter Pgrac212 thuộc nhóm thứ 2 có khả năng cho phép biểu hiện protein tái tổ hợp nội bào lên đến hơn 26% protein tổng (chưa công bố). Trong nghiên cứu này, vector biểu hiện với promoter Pgrac212 được sử dụng để biểu hiện CK1D trong *B. subtilis*.

Trong nghiên cứu cơ bản hay ứng dụng cần protein tái tổ hợp, việc biểu hiện và tính chế protein một cách dễ dàng ở mức cao luôn là lựa chọn được ưu tiên hàng đầu. Chính vì vậy mà việc sử dụng *E. coli* để biểu hiện và tính chế protein tái tổ hợp luôn là lựa chọn đầu tiên trong các thí nghiệm cần thu nhận protein. Tuy nhiên, việc biểu hiện các protein kinase trong *E. coli* không phải lúc nào cũng diễn ra một cách thuận lợi. Do vậy, thậm chí các hệ thống biểu hiện đơn giản cho phép biểu hiện và tính chế protein tái tổ hợp với số lượng lớn một cách dễ dàng là một trong các hướng mà chúng tôi quan tâm. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng CK1D như một protein mô hình để biểu hiện kinase trong *B. subtilis* nhằm thiết lập quy trình thu nhận protein kinase trong *B. subtilis* và tìm hiểu khả năng sử dụng *B. subtilis* cho việc biểu hiện và tính chế protein tái tổ hợp. Ngoài ra, với mục tiêu là thiết lập phương pháp thu nhận protein CK1 tinh sạch cho mục đích nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi tiến hành công bố gene mã hóa cho vùng kinase của CK1D và tính chế qua hai bước gồm trao đổi ion trên SP-Sepharose và sắc ký ái lực với protein casein-agarose (Longenecker et al. 1996), tuy nhiên việc tính chế theo phương pháp này trở nên rất khó khăn và tốn nhiều thời gian. Để thực hiện việc sắc ký ái lực một cách dễ dàng hơn, CK1D được gắn với một đuôi dung hợp có chứa His-tag cùng với vị trí cắt của protease TEV. Protein được tinh sạch thông qua sắc ký ái lực qua cột Ni-NTA, loại bỏ đuôi dung hợp, trao đổi dung dịch và lọc gel.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chúng vi sinh vật, plasmid và môi trường nuôi cấy. *E. coli* OmniMAX (Invitrogen) được dùng để dòng hóa và

subtilis 1012 (*leuA8 metB5 trpC2 hsdRMT*) được dùng để biểu hiện protein tái tổ hợp. 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 gene dung hợp mã hóa cho LysSN-His-TEV được cung cấp bởi Công ty TNHH Công nghệ Sinh học HT. Plasmid pCKD1 dùng làm khuôn để khuếch đại gene mã hóa cho CK1D được cung cấp bởi TS. Daniel Rauh. Các plasmid được sử dụng để khảo sát sự biểu hiện bao gồm pHT1161 và pHT1162 có sơ đồ cấu trúc như Hình 1. Tế bào *E. coli* và *B. subtilis* được nuôi cấy lên môi trường Luria broth (LB) ở 37°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*).

Dòng hóa plasmid pHT1161 và pHT1162. Plasmid pHT1161 (*Pgrac212*-CK1D) có mang gene mã hóa cho CK1D chịu sự kiểm soát của promoter *Pgrac212* được thiết kế như sau. Gene mã hóa cho CK1D được khuếch đại sử dụng cặp mồi, CK1D_F, 5'-GGAAGGATCCATGGAGCTGAGGGTCGGGAATAG-3' (vị trí cắt của *Bam*HI được gạch dưới) và CK1D_R, 5'-CGACGGACGTCGGGCGCGCCAGGCGCTG-3' (vị trí cắt của *Acl*I được gạch dưới) với khuôn pCK1D. Sản phẩm PCR được xử lý bằng *Bam*HI, nối với pHT212 được xử lý *Bam*HI và *Acl*I và sản phẩm nối được biến nạp vào *E. coli*. Plasmid pHT1162 được tạo ra bằng cách khuếch đại đoạn gene dung hợp có chứa LysSN-His-TEV và chèn vào pHT1161 lại *Bam*HI sử dụng kit In-Fusion (Clontech). Các mồi được sử dụng để khuếch đại đoạn gene dung hợp này gồm LysSN_F, 5'-TTAAAGGAGGAAGGATCTATGAGTCAAGAAGAACATACATGAA-3' và LysSN_R, 5'-GACCCTCAGCTCCATCCCTGGAGTAGAGTTCTACCCGCCACGCGCCAGAAATGATGATGATGGTGAGATCC-3' (vùng DNA gạch dưới cần cho dung hợp). Các plasmid tạo thành được giải trình tự để kiểm tra linh nguyên vẹn và đồng khuôn của các đoạn gene. Hình 1B thể hiện sơ đồ của plasmid pHT1162, vùng promoter, gene mục tiêu và vị trí các mồi.

Khảo sát biểu hiện của protein mục tiêu (bước 2, Hình 1A). Chúng *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 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) và được rửa. 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 1C).

Thu nhận protein CK1D qua cột HisTrap (bước 3 và 4, Hình 1A). Tế bào được nuôi cấy ở 23°C và thu nhận tương tự như việc khảo sát biểu hiện. Tế bào được phá vỡ bằng lysozyme và sonicator trong đệm ly giải/đệm 1 (Napi 50 mM, pH = 7,6, 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 5 ml (GE Healthcare) trên máy FPLC. Tất cả các bước qua cột đều được thực hiện trong phòng 7°C. Tốc độ dòng cho qua cột là 2 ml/phút. Sau khi nạp mẫu, cột được rửa bằng đệm rửa/đệm 2 (Napi 50 mM, pH = 7,6, NaCl 300 mM, glycerol 5%, imidazole 20 mM, DTT 1 mM). Sau cùng protein được thu nhận bằng đệm 3 (Napi 50 mM, pH = 7,6, NaCl 300 mM, glycerol 5%, imidazole 250 mM, DTT 1 mM) theo gradient nồng độ imidazole. Một số các phân đoạn sau khi qua cột được phân tích trên SDS-PAGE. Các phân đoạn có chứa protein dung hợp (CK1D fusion) sẽ được thu nhận cho bước tiếp theo.

Protein được thu nhận ở trên sẽ được cắt 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 được sử dụng trong phản ứng cắt TEV (Tris-HCl 25 mM, pH 7,6, NaCl 100 mM, Glycerol 10%, DTT 1 mM, EDTA 0,5 mM). Mẫu sau khi cắt được loại bỏ EDTA và nạp lại qua cột HisTrap HP 5 ml với tốc độ dòng 2 ml/phút trên máy FPLC. Thu nhận các mẫu đi qua cột và các mẫu được dung ly theo gradient nồng độ imidazole; phân tích các mẫu này trên SDS-PAGE để xác định các phân đoạn chứa protein mục tiêu và thu nhận lại cho bước tinh chế kế tiếp.

Tinh chế protein CK1D theo phương pháp trao đổi cation, lọc gel và xác định khối lượng phân tử (bước 5, 6 và 7, Hình 1A). Đệm của mẫu protein được thu nhận ở bước 4 ở trên được thay đổi đệm thẩm tách (dialysis buffer)/đệm 4 để giảm NaCl xuống còn 20 mM NaCl và được nạp lên cột HiTrap SP FF 1 ml với tốc độ dòng 1 ml/phút trên máy FPLC. Cột sẽ được rửa bằng đệm thẩm tách và sau đó protein được thu nhận sử dụng đệm B cation/đệm 5 (Tris-HCl 25 mM, pH 7,6, NaCl 500 mM, Glycerol 10%, DTT 1 mM) theo gradient nồng độ NaCl; phân tích các mẫu này trên SDS-PAGE để xác định các phân đoạn chứa protein mục tiêu và thu nhận lại cho bước kế tiếp. Protein được thu nhận ở bước 5/trao đổi cation sẽ được nạp qua cột Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) với tốc độ dòng chảy 1 ml/phút trên máy FPLC. Đệm 6 dùng cho lọc gel có thành phần gồm: Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, NaCl 300 mM, Glycerol 10%, DTT 1 mM, EDTA 1 mM. Các phân đoạn được thu nhận sẽ phân tích trên gel SDS-PAGE. Mẫu protein được trao đổi đệm bằng nước sử dụng bộ kit DyeEx 2.0 Spin kit (Qiagen). 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.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

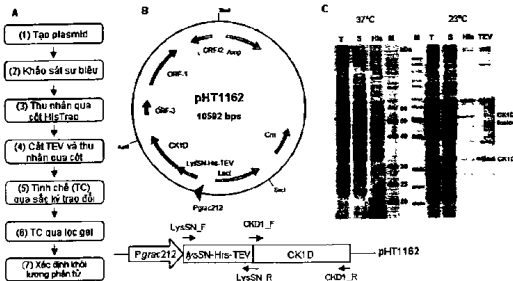
Với mục tiêu là tinh chế protein CK1D, chúng tôi đã tiến hành tạo plasmid pHT1162 trong đó CK1D được dung hợp với phần đầu N của gen mã hóa lysine synthetase, His-tag và vị trí cắt của TEV (LysSN-His-TEV-CK1D, được gọi là CK1D fusion). Protein CK1D fusion được biểu hiện trong *B. subtilis* 1012 và được thu nhận thông qua cột HisTrap; protein này sau đó được cắt bằng TEV và thu nhận lại qua cột HisTrap. Mẫu protein sau khi cắt bằng TEV có ái lực với cột HisTrap sẽ bị giữ lại. Các phân đoạn chứa protein CK1D sau đó sẽ được tinh chế thông qua sắc ký trao đổi cation và lọc gel. Sau cùng sẽ được kiểm tra lại khối lượng phân tử bằng LC-ESI-MS. Các nội dung chính trong báo cáo này được sơ đồ hóa trong Hình 1A.

Tạo plasmid và kiểm tra sự biểu hiện tan

Plasmid pHT1162 có mang gen mã hóa cho CK1D fusion (LysSN-His-TEV-CK1D) được tạo ra với sơ đồ như Hình 1B. Sơ đồ vị trí promoter *Pgrac212*, vị trí của các phân dung hợp và các mồi được thể hiện như trên Hình 1B. Đây là

plasmid con thời cho phép dòng hóa trong *E. coli* với gen kháng sinh ampiciline và biểu hiện trong *B. subtilis* với gen kháng sinh chloramphenicol.

Chúng tôi tiến hành sàng lọc các chủng *B. subtilis* 1012 có mang plasmid pHT1162 được sử dụng khảo sát sự biểu hiện tan và sự bám lên cột. Đầu tiên chúng tôi khảo sát sự biểu hiện tan ở 37°C (Hình 1C), tuy nhiên hầu hết các protein ở dạng không tan vì trong mẫu protein tan (S) không chứa protein mục tiêu và hệ quả là protein không thể bám lên hạt agarose Ni-NTA. Một trong những cách để làm tăng tính tan của protein là làm giảm nhiệt độ trong quá trình biểu hiện; đây là một trong những giải pháp thường được thực hiện cho *E. coli*. Thí nghiệm được thực hiện ở 23°C (Hình 1C) cho thấy protein mục tiêu có xuất hiện ở mẫu protein tan (S); protein mục tiêu này với kích thước khoảng 56 kDa đã có thể bám lên hạt agarose Ni-NTA. Nhằm kiểm tra protein được bám lên cột có phải là protein CK1D fusion hay không, chúng tôi đã tiến hành xử lý chúng với TEV. Kết quả trên giếng TEV (Hình 1C) cho thấy protein mục tiêu CK1D fusion bị cắt và cho ra vạch protein có kích thước tương ứng với kích thước CK1D, khoảng 37 kDa. Như vậy, protein dung hợp CK1D có thể được biểu hiện tan trong *B. subtilis* ở 23°C và có thể sử dụng điều kiện này để biểu hiện trong bình nuôi cấy hay fermentor lớn hơn và bán hành tính chế trong các bước kế tiếp.



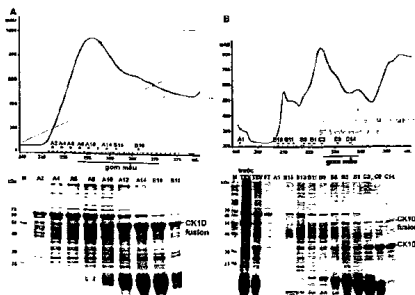
Hình 1. Sơ đồ của các bước thí nghiệm chính, plasmid pHT1162 và kiểm tra sự biểu hiện của CK1D dung hợp. A, sơ đồ các bước thí nghiệm chính. B, sơ đồ của plasmid pHT1162 và sơ đồ vị trí promoter Pgrac212 gen dung hợp và vị trí của các môđun của PCR. C, SDS-PAGE khảo sát sự biểu hiện của protein dung hợp ở 37°C và 23°C (bước 2, Hình 1A); CK1D fusion là protein dung hợp gồm LysSN-His-TEV-CK1D (trong đó TEV là vị trí nhận biết của enzyme TEV); T, protein tổng; S, phần đoạn protein hòa tan, His, phần đoạn protein hòa tan bám lên hạt agarose Ni-NTA; TEV là mẫu protein bám lên hạt agarose Ni-NTA được xử lý bằng TEV; M, thang protein

Thu nhận CK1D qua cột HisTrap

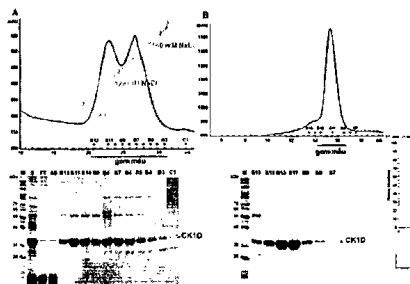
Tế bào có biểu hiện protein CK1D dung hợp được phá vỡ và tách protein tan thu nhận sau khi ly tâm gradient nạo vào cột HisTrap HP 5 ml được gắn lên cột FPLC (bước 3, Hình 1A). Protein được dung ly ra khỏi cột dựa trên gradient nồng độ imidazole. Dựa trên phổ FPLC cho thấy có xuất hiện 1 đỉnh hấp thụ lớn, tuy nhiên khi phân tích trên SDS-PAGE cho thấy có khá nhiều protein khác của tế bào có ái lực với cột HisTrap HP. Trên hình SDS-PAGE (Hình 2A) cho thấy protein dung hợp CK1D mục tiêu có kích thước khoảng 56 kDa bắt đầu xuất hiện ở nồng độ 85 mM imidazole (A8). Các phần đoạn từ A8 cho đến B6 được gom lại và thực hiện phản ứng cắt bằng TEV (bước 4, Hình 1A). Sau khi cắt bằng TEV cho thấy hầu hết protein CK1D dung hợp đều bị cắt cho vạch có kích thước khoảng 37 kDa tương ứng với kích thước CK1D (TEV, Hình 2B). Sản phẩm cắt bằng TEV sau đó được nạp lại lên cột HisTrap, thu nhận tất cả các phần đoạn và phân tích trên gel SDS-PAGE. Kết quả cho thấy, không như dự đoán, protein CK1D bị cắt không mang đuôi His-tag nhưng vẫn bám lên cột và bắt đầu dung ly ở nồng độ 57,5 mM imidazole. Các phần phân đoạn từ C3 đến D14 gom lại và sử dụng cho bước tinh chế kế tiếp. Kết quả trên cho thấy protein CK1D có thể thu nhận thông qua cột HisTrap kết hợp với TEV. Protein CK1D có thể được thu nhận tương đối sạch ở nồng độ imidazole cao hơn 87 mM và với gradient nồng độ imidazole theo thời gian lâu hơn thì có thể thu nhận CK1D sạch hơn.

Tinh chế qua sắc ký trao đổi cation, lọc gel và xác định khối lượng phân tử

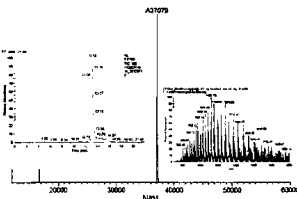
Mẫu protein gom lại sau khi cắt bằng TEV và qua cột HisTrap ở trên được thay đổi đệm làm giảm NaCl xuống còn 20 mM bằng cách sử dụng màng thẩm tích. Sau đó mẫu protein sẽ được nạp vào cột HiTrap SP và protein được dung ly theo gradient nồng độ NaCl tăng dần (bước 5, Hình 1A). Trên sắc ký trao đổi cation cho thấy có hai đỉnh hấp thụ UV, nhưng khi phân tích trên SDS-PAGE đều cho cùng kích thước tương ứng với CK1D (Hình 3A). Điều này cho thấy có hai nhóm protein CK1D có kiểu tích điện trên bề mặt CK1D khác nhau. Tuy nhiên, khi mẫu được phân tích bằng LC-ESI-MS đều cho kích thước như nhau. Do vậy, các mẫu xuất hiện trên cả hai đỉnh hấp thụ UV đều được gom lại để tinh chế qua lọc gel



Hình 2: Thu nhận protein CK1D sử dụng cột có ái lực với His-tag. Hai đường cong sắc ký phía trên được thể hiện các mẫu protein qua cột HisTrap HP 5ml trên hệ thống FPLC; đường màu xanh dương thể hiện UV của mẫu sau khi ra khỏi cột, đường màu xanh lá cây thể hiện gradient nồng độ Imidazole; các phân đoạn được sử dụng để chạy điện di SDS-PAGE có chấm đen và làm nổi. A, Thu nhận qua cột HisTrap (bước 3, Hình 1A); dịch tế bào *B. subtilis* bị phá vỡ và cho gắn lên cột HisTrap trên hệ thống FPLC; SDS-PAGE thể hiện các phân đoạn thu nhận được sau khi chạy qua cột trên máy FPLC. B, cắt protein dung hợp bằng TEV và thu nhận qua cột (bước 4, Hình 1A); mẫu protein sau khi được thu nhận ở trên (trước TEV) được cắt bằng TEV với mẫu sau khi cắt được thể hiện bằng TEV (trên SDS-PAGE); mẫu được cắt này sau đó qua cột HisTrap và dung dịch đi qua cột (FT); các phân đoạn khác thu nhận được sau đó tương ứng với các phân đoạn được làm nổi trên đường cong sắc ký.



Hình 3: Tinh sạch protein CK1D theo phương pháp trao đổi cation và lọc gel. Hai đường cong sắc ký phía trên được thể hiện các mẫu protein được tinh chế theo phương pháp cation và lọc gel trên hệ thống FPLC; đường màu xanh dương thể hiện UV của mẫu sau khi ra khỏi cột, đường màu xanh lá cây thể hiện gradient nồng độ NaCl; các phân đoạn được sử dụng để chạy điện di SDS-PAGE có chấm đen và làm nổi. A, Tinh chế theo phương pháp trao đổi cation (bước 5, Hình 1A); mẫu CK1D sau khi cắt bằng TEV và qua cột HisTrap được cho qua cột HiTrap SP FF 1 ml; SDS-PAGE thể hiện các phân đoạn thu nhận được sau khi chạy qua cột trên máy FPLC. B, tinh chế qua lọc gel (bước 6, Hình 1A); mẫu sau khi qua cột cation được nạp vào cột Superdex 75 10/300 GL; SDS-PAGE thể hiện các phân đoạn thu nhận được sau khi chạy qua cột trên máy FPLC



Hình 4: Xác định khối lượng phân tử của CK1D. Mẫu protein thu nhận sau khi lọc gel được thay đổi đệm sang nước và mẫu này được nạp vào máy LC-ESI-MS. Khối lượng phân tử được tính bằng cách sử dụng chương trình MagTran. Protein CK1D có kích thước mong đợi là 36892 Da và kết quả đo là 37079 Da. Kết quả có khối lượng phân tử cao hơn 87 Da. Sự chênh lệch này có thể là protein đã bị phosphoryl hóa nên có thêm một nhóm phosphate.

Mẫu được nạp vào cột Superdex 75 10/300 GL và chạy với tốc độ dòng 1 ml/phút. Phân tích các phân đoạn thu được xung quanh đỉnh hấp thụ cho thấy có thể thu nhận được protein khá tinh sạch (B13, B11, Hình 3B). Mẫu protein CK1D tinh sạch này sau đó được sử dụng để phân tích khối lượng phân tử sử dụng LC-ESI-MS. Kết quả phân tích khối lượng phân tử cho thấy kích thước protein 37079 Da (Hình 4), trong khi khối lượng phân tử được tính toán trên lý thuyết là 36892 Da; ở đây có sự sai khác 87 Da. Sự chênh lệch này có thể được lý giải là do mẫu protein có thể đã bị phosphoryl hóa nên có thêm một nhóm phosphate gắn vào. Đây là vấn đề thường thấy khi biểu hiện protein kinase.

KẾT LUẬN

Dựa trên các kết quả thực hiện được chúng tôi kết luận như sau. Có thể biểu hiện và tinh chế protein kinase CK1D của người trong *B. subtilis*. Hệ thống biểu hiện *B. subtilis* có khả năng được mở rộng sử dụng để tinh chế cho các protein kinase khác.

Lời cảm ơn

Cảm ơn TS. Daniel Roach đã cung cấp gen mã hóa cho CK1D vào các thảo luận. 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

- Biswas A, Mukherjee S, Das S, Shields D, Chow CW, Mitra U (2011). Opposing action of casein kinase 1 and calcineurin in nucleocytoplasmic shuttling of mammalian translation initiation factor eIF6. *J Biol Chem* 286(4): 3129-3138.
- Cheong JK, Virshup DM (2011). Casein kinase 1: Complexity in the family. *Int J Biochem Cell Biol* 43(4): 465-469
- Longenecker KL, Roach PJ, Hurley TD (1996). Three-dimensional structure of mammalian casein kinase I: molecular basis for phosphate recognition. *J Mol Biol* 257(3): 618-631.
- Meng QJ, Maywood ES, Bechtold DA, Lu WQ, Li J, Gibbs JE, Dupré SM, Chesham JE, Rajamohan F, Knafels J, Sneed B, Zawadzke LE, Ohren JF, Walton KM, Wager TT, Hastings MH, Loudon AS (2010). Entrainment of disrupted circadian behavior through inhibition of casein kinase 1 (CK1) enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(34): 15240-15245.
- 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 (2010). Establishment of a simple and rapid method to screen for strong promoters in *Bacillus subtilis*. *Protein Expr Purif* 71(2): 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(1): 167-172.
- Xu Y, Padlath QS, Shapiro RE, Jones CR, Wu SC, Saigoh N, Saigoh K, Ptáček LJ, Fu YH (2005). Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature* 434(7033): 840-844

EXPRESSION AND PURIFICATION OF HUMAN CASEIN KINASE 1 (CK1D) IN *BACILLUS SUBTILIS*

Nguyen Duc Hoang* and Phan Thị Phương Trang

Center for Bioscience and Biotechnology, University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City

SUMMARY

Though *Bacillus subtilis* has been used to express secreted proteins for many years in industry, studies on applying it to express recombinant proteins in cytoplasm remain unexplored. Casein kinase (CK1D) has an important role in aberrant circadian rhythm and modulating the nuclear export of eukaryotic translation initiation factor 6 (eIF6), a protein with essential nuclear and cytoplasmic roles in biogenesis of the 60S subunit of the eukaryotic ribosome. In this study we used CK1D as a model protein for expression and purification of its kinase domain in *B. subtilis* using the plasmid that we have recently developed. First, gene encoding CK1D was introduced into an expression vector for *B. subtilis*, in which CK1D was fused with a His-tag. Next, the influence of temperature on the soluble expression of the fusion CK1D was investigated. Then, His-tag cleaved CK1D was purified using affinity chromatography, removal of the fusion tag, ion exchange and size exclusion. The mass of purified CK1D was measured using LC-MS. The result demonstrated that *B. subtilis* can be used as a host to express recombinant protein in cytoplasm and the purified CK1D protein can be used in other biochemical and biophysical studies.

Key words: *Bacillus subtilis*, CK1D, pHT vector, Pgrac212.

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