

SỬ DỤNG VECTOR pHT01 ĐỂ KHẢO SÁT SỰ BIỂU HIỆN TIẾT PROTEIN CHỈ THỊ α -AMYLASE TRONG *BACILLUS SUBTILIS* WB800N

Phan Thị Phượng Trang, Nguyễn Hoài Nam, Trần Linh Thuộc, Nguyễn Đức Hoàng

Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Sự xuất hiện plasmid cảm ứng thương mại đầu tiên, pHT01 bên về mặt cấu trúc đã thúc đẩy khuynh hướng nghiên cứu cảm ứng biểu hiện vượt mức protein tái tổ hợp cho *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*). Các nghiên cứu có liên quan đến plasmid này đều được thực hiện trên các chủng *B. subtilis* có nguồn gốc từ 168, như *B. subtilis* 1012, nhưng chưa được thực hiện trong chủng *B. subtilis* WB800N – chủng bị đột biến bất hoạt 8 protease ngoại bào. Để thăm dò khả năng sử dụng plasmid pHT01 với *B. subtilis* WB800N trong biểu hiện protein tiết vượt mức, chúng tôi sử dụng chỉ thị α -amylase tiết được mã hóa bởi *amyQ* của *Bacillus amyloliquefaciens*. Plasmid pHT43-*amyQ* được tạo ra và sử dụng để khảo sát biểu hiện tiết α -amylase trong hai chủng *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N. Kết quả cho thấy khả năng biểu hiện α -amylase tiết hiệu quả trong cả hai chủng *B. subtilis*, trong đó lượng protein tạo ra ở WB800N có phần cao hơn 1012. Điều này cho thấy tiềm năng sử dụng plasmid pHT01 với *B. subtilis* WB800N cho mục đích biểu hiện protein tái tổ hợp tiết.

Từ khóa: *amyQ*, *Bacillus subtilis*, plasmid pHT, pHT01, promoter *Pgrac*, WB800N

MỞ ĐẦU

Chiến lược sản xuất protein tái tổ hợp từ các chủng vi sinh vật đang được phát triển mạnh và đã đạt được những thành tựu đáng kể trong nhiều năm qua. Có thể nói, *Escherichia coli* (*E. coli*) được sử dụng như một nhà máy sản xuất protein tái tổ hợp từ rất sớm và khá phổ biến cho đến ngày nay (Peti, Page, 2007). Nhưng bên cạnh những ưu điểm như thông tin di truyền được hiểu rõ, thao tác đơn giản, có sẵn nhiều loại vector cũng như các chủng đột biến có lợi thì *E. coli* lại bộc lộ một số bất lợi do tích lũy độc tố, gây bệnh ở người và không có khả năng tiết protein hiệu quả (Petsch, Anspach, 2000). Vì vậy các chủng vi sinh vật an toàn hơn đang được chú trọng phát triển, tiêu biểu là *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), một sinh vật mô hình của vi khuẩn Gram dương. Vi khuẩn này có nhiều ưu điểm như: (i) chủng vi sinh vật an toàn dùng trong thực phẩm, được tổ chức FDA (Food and Drug Administration) của Mỹ đánh giá là thuộc nhóm vi sinh vật an toàn; (ii) có khả năng lên men ở mật độ cao; (iii) có khả năng tiết hiệu quả protein ra ngoài tế bào, dễ dàng cho việc tinh chế protein mục tiêu (Harwood, 1992; Schallmey et al., 2004; Schumann, 2007). Hiện nay, số lượng các chủng *B. subtilis* được ứng dụng trong nghiên cứu và sản xuất ngày càng tăng. Bằng cách tạo ra những đột biến có lợi, các nhà khoa học đã tạo ra nhiều chủng *B. subtilis* mới phù hợp với nhu cầu sử dụng. Tiêu biểu trong số đó là các chủng mang

đột biến trên các protease ngoại bào như *B. subtilis* WB800 (Wu et al., 2002) Nhưng vì WB800 mang gene kháng chloramphenicol (Cm), không tương thích với dòng plasmid pHT, nên WB800N (Nguyen et al., 2011) đã được tạo ra để khắc phục nhược điểm này.

Promoter đầu tiên được sử dụng để kiểm soát sự biểu hiện trên *B. subtilis* là *Pspac*, cảm ứng bằng Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Yansura, Henner, 1984). Tiếp sau đó là một loạt các hệ thống sử dụng các chất cảm ứng như tetracycline (Geissendorfer, Hillen, 1990), xylose (Kim et al., 1996), citrate (Yamamoto et al., 2000), subtilin (Bongers et al., 2005), glycine (Phan, Schumann, 2007) và hệ thống khác dựa trên T7 RNA polymerase (Chen et al., 2010). Gần đây, chúng tôi tạo ra promoter cảm ứng mới cho *B. subtilis* được đặt tên là *Pgrac* (Phan et al., 2006), dung hợp từ promoter mạnh *groESL* có nguồn gốc từ *B. subtilis* với *lac operator* (*lacO*) từ *E. coli*, sử dụng chất cảm ứng là IPTG, cho khả năng biểu hiện protein mục tiêu lên đến 16% protein tổng số, gấp 50 lần so với *Pspac* (Phan et al., 2012). Hệ thống plasmid đầu tiên dựa trên promoter này là pHT01 (Nguyen et al., 2007), một trong những plasmid được phân phối bởi Mobitec. Tuy nhiên, các thông tin về khả năng sử dụng các plasmid này có nguồn gốc từ promoter *Pgrac* này với các chủng vi khuẩn khác nhau vẫn còn rất hạn chế.

Trong nghiên cứu này, nhằm mục đích khảo sát khả năng sử dụng plasmid pHT01 để biểu hiện protein tiết trong chủng chủ môi *B. subtilis* WB800N, chúng tôi sử dụng gene chỉ thị *amyQ* mã hóa enzyme α -amylase từ *B. amyloliquefasciens* (Palva, 1982). Đây là một chỉ thị được sử dụng khá phổ biến trong các nghiên cứu về hệ thống tiết do mức độ biểu hiện dễ dàng nhận biết thông qua hoạt tính phân cắt cấu trúc amylose trong tinh bột, làm mất màu thuốc thử I_2/KI (Nicholson, Chambliss, 1985). Gene *amyQ* được chèn vào vùng Multi Cloning Site (MCS) của pHT01 tạo thành pHT43-*amyQ*. Sự kiểm soát biểu hiện tiết α -amylase của plasmid pHT43-*amyQ* trong *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N khảo sát.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật, plasmid và môi trường nuôi cấy

Chủng *E. coli* OmniMAX (Invitrogen) được sử dụng trong các bước đồng hóa. Hai chủng *B. subtilis* được sử dụng để biểu hiện protein mục tiêu bằng chất cảm ứng là IPTG (i) chủng *B. subtilis* 1012 (Saito et al., 1979) biểu hiện protease ngoại bào; (ii) chủng *B. subtilis* WB800N (Nguyen et al., 2011) mang gene kháng neomycine thay vì Cm và mang để biến bất hoạt tám protease ngoại bào từ chủng WB800 (Wu et al., 2002). Ưu điểm của chủng WB800N là ít biểu hiện protease ngoại bào, thuận lợi cho việc biểu hiện các protein đích dạng tiết do sự tích tụ tăng dần và giảm sự thủy phân protein đích bởi các protease ngoại bào. Plasmid pHT01 chứa promoter *Pgrac* và gene *lacI* được sử dụng làm khung sườn để thiết kế plasmid pHT43-*amyQ*. Mẫu chứng âm được thực hiện với plasmid pHT43 (Nguyen et al., 2011) có cấu trúc giống với pHT01 nhưng có thêm trình tự tín hiệu tiết của α -amylase, *SamyQ*. Tế bào được nuôi cấy lắc trên môi trường Luria broth (LB) ở 37°C, kháng sinh được thêm vào với nồng độ tương ứng (ampicillin 100 μ g/ml đối với *E. coli* và Cm 10 μ g/ml đối với *B. subtilis*). Tế bào được trải trên môi trường thạch chứa 2% tinh bột không tan để quan sát hoạt tính α -amylase.

Thiết kế plasmid

Đoạn gene *amyQ* (bao gồm cả trình tự tiết của α -amylase) được thu nhận từ plasmid pKTH10 (Palva, 1982) bằng phản ứng PCR, sử dụng cặp mồi ON29, 5'-GGCCATGGATCCATGATTCAAAACGAAAGCGGACAG-3' và ON42, 5'-GGCCATGACGCTCTTCTGAACATAAATGGAG

ACGGAC-3'. Đoạn gene sau khi khuếch đại có kích thước 1545 bp được cắt với 2 enzyme cắt *Bam*HI và *Aar*II, sau đó nối với pHT01 cũng được xử lý với 2 enzyme cắt trên. Vector tái tổ hợp mới tạo thành được đặt tên là pHT43-*amyQ*. Sản phẩm nối được biến nạp vào chủng *E. coli* OmniMAX, sàng lọc và kiểm tra đoạn chèn bằng giải trình tự trước khi biến nạp vào hai chủng *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N.

Khảo sát hoạt tính α -amylase trên đĩa thạch

Sau khi sàng lọc và kiểm tra, khuẩn lạc đơn của hai chủng *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N chứa plasmid pHT43-*amyQ* được nuôi cấy trên đĩa LB chứa 10 μ g/ml Cm không bổ sung (0 mM IPTG) hoặc có bổ sung IPTG từ 0,001, 0,01 và 0,1 mM. 2% tinh bột không tan. Ủ trong 16 giờ ở 37°C. Sử dụng dung dịch I_2/KI để xác định vòng phân giải tinh bột do α -amylase (Nicholson, Chambliss, 1985). Chứng âm là pHT43 cảm ứng với 0,1 mM IPTG. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần trên 3 khuẩn lạc khác nhau.

Cảm ứng biểu hiện α -amylase trên môi trường lỏng

Hai chủng *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N được nuôi cấy trong môi trường LB với kháng sinh Cm 10 μ g/ml ở 37°C và tốc độ lắc 250 vòng/phút. Đến khi tế bào vào giữa pha log, OD₆₀₀ đạt 0,8 tiến hành cảm ứng ở 4 nồng độ IPTG (0, 0,001, 0,01 và 0,1 mM). Mẫu được thu ở 0, 2, 4 và 6 h sau khi cảm ứng. Thực hiện tương tự với mẫu chứng âm là hai chủng *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N chứa plasmid pHT43, cảm ứng và thu mẫu âm ở 6 h. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần trên 3 khuẩn lạc khác nhau.

Kiểm tra sự biểu hiện bằng SDS-PAGE

Mẫu sau khi thu ở các thời điểm sẽ được tách tế bào ra khỏi môi trường nuôi cấy bằng ly tâm (13000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút). Protein có trong dịch nuôi cấy được thu nhận bằng phương pháp rửa TCA (40%), với tỉ lệ TCA và dịch nuôi cấy là 1:3, ủ trong đá 10 phút. Sau đó ly tâm (13000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút) thu tủa và rửa tủa 2 lần với acetone lạnh. Phơi khô ở nhiệt độ phòng, bổ sung nước, sample buffer và biến tính bằng nhiệt (95°C, 5 phút). Tiến hành điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamide 12% và tính tỉ lệ α -amylase trên tổng số protein tiết bằng phần mềm AlphaEaseFC (Alpha Innotech) (http://genetictchnologiesinc.com/alpha/alpha_case_fc.htm).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

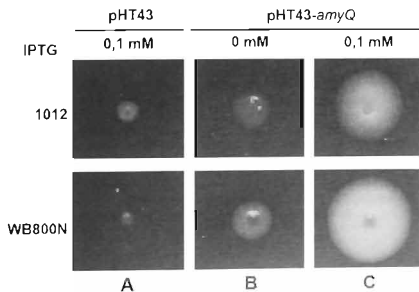
Thiết kế vector pHT43-amyQ

Gene *amyQ* được thu nhận bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu mang trình tự nhận biết của enzyme cắt giới hạn *Bam*HI và *Aat*II. Sản phẩm PCR (1545 bp) và plasmid pHT01 được xử lý với hai enzyme *Bam*HI và *Aat*II, sau đó tiến hành phản ứng nối với enzyme T4 ligase. Sản phẩm nối được biến nạp vào *E. coli* OmniMAX, sau đó tiến hành sàng lọc và giải trình tự nhằm xác định plasmid pHT43-*amyQ*. Plasmid tái tổ hợp sau khi tách chiết từ chủng *E. coli* OmniMAX/pHT43-*amyQ* sẽ được biến nạp vào *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N. Trải trên môi trường LB-Cm nhằm sàng lọc những tế bào mang plasmid mục tiêu. Các khuẩn lạc đặc trưng *B. subtilis* 1012/ pHT43-*amyQ* và *B. subtilis* WB800N/ pHT43-*amyQ* sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm khảo sát ở phần sau.

Khảo sát hoạt tính α -amylase

Khuẩn lạc đơn *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N mang plasmid pHT43 hoặc pHT43-*amyQ* được chấm sang đĩa LB bổ sung Cm, 2% tinh bột không tan, không chứa chất cảm ứng (Hình 1B) hoặc

có chứa chất cảm ứng với nồng độ IPTG là 0,001, 0,01 và 0,1 mM, ủ 16 giờ ở 37°C. Vòng phân giải tinh bột hình thành do α -amylase được tiết ra môi trường xung quanh phân cắt cấu trúc amylose trong tinh bột, vùng môi trường thiếu tinh bột không thể bắt màu với dung dịch I₂/KI, vòng phân giải càng rộng khi α -amylase được tiết càng nhiều. Kết quả cho thấy hai chủng *B. subtilis* mang plasmid pHT43-*amyQ* cho đường kính vòng phân giải tinh bột lớn hơn nhiều (Hình 1B: 0 mM IPTG và Hình 1C: 0,1 mM IPTG) so với chủng âm. *B. subtilis* mang plasmid pHT43 (Hình 1A). Điều này chứng tỏ gene *amyQ* trên pHT43-*amyQ* được biểu hiện vượt mức dưới sự điều hòa của promoter mạnh *Pgrac*. Ở các nồng độ IPTG 0,001 mM và 0,01 mM cho vòng phân giải lớn hơn trường hợp 0 mM IPTG và nhỏ hơn trường hợp 0,1 mM IPTG, nhưng không đáng kể (kết quả không thể hiện). So sánh giữa hai chủng *B. subtilis*, vòng phân giải tinh bột xung quanh khuẩn lạc *B. subtilis* WB800N (Hình 1, Dưới) hơi cao hơn so với vòng phân giải của *B. subtilis* 1012 (Hình 1, Trên). Như vậy, việc loại bỏ protease ngoại bào ở *B. subtilis* WB800N cho phép α -amylase tiết ra môi trường có phản hơi cao hơn so với chủng *B. subtilis* 1012.



Hình 1. Khảo sát sự biểu hiện của α -amylase trên đĩa thạch *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N chứa plasmid pHT43-*amyQ* không cảm ứng (B) hoặc có cảm ứng với IPTG ở nồng độ 0,1 mM (C) Mẫu chứng âm pHT43 được cảm ứng với 0,1 mM IPTG (A). Đường kính màu trắng là bán kính vòng phân giải

Cảm ứng biểu hiện và SDS-PAGE

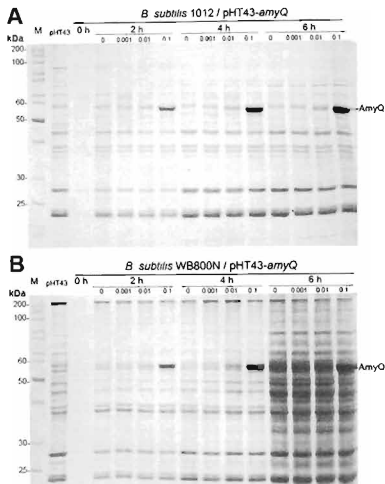
Để đánh giá mức độ biểu hiện và tiết α -amylase trước và sau khi cảm ứng, chúng tôi tiến hành nuôi

cây của hai chủng *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N chứa plasmid pHT43 hoặc pHT43-*amyQ* trong môi trường LB-Cm, cảm ứng với 0,001, 0,01 và 0,1 mM IPTG và thu mẫu sau 0, 2, 4, 6 giờ cảm

ứng. Dịch nuôi cấy chứa α -amylase được thu nhận và xử lý như đã nêu ở phần Vật liệu – Phương pháp.

Quan sát kết quả ở mẫu cảm ứng với nồng độ IPTG thấp (0,001 và 0,01 mM) (Hình 2), mức độ biểu hiện protein mục tiêu rất thấp, tương đương với mẫu không cảm ứng (Hình 2; 0 h). Tuy nhiên, khi tăng nồng độ IPTG lên 0,1 mM thì mức độ biểu hiện

lại tăng đáng kể lên đến 30% protein tổng số (AlphaEaseFC). Trong khi các mẫu trước cảm ứng (Hình 2; 0 h) không nhận thấy sự hiện diện của vạch protein mục tiêu. Như vậy sự chênh lệch về mức độ biểu hiện giữa trước và sau cảm ứng là rất cao, hay nói cách khác, khả năng kiểm soát biểu hiện của promoter *Pgrac* là rất chặt chẽ.



Hình 2. Kết quả điện di SDS-PAGE M, thang protein PageRuler™ Unstained (Fermentas) Chủng *B. subtilis* 1012 (A) và *B. subtilis* WB800N (B) mang plasmid pHT43-amyQ cảm ứng bằng IPTG với nồng độ 0 mM (0), 0,001 mM (0,001), 0,01 mM (0,01), 0,1 mM (0,1) khi OD₆₀₀ đạt 0,8. Thu mẫu ở các thời điểm 0 giờ (0 h), 2 giờ (2 h), 4 giờ (4 h), 6 giờ (6 h) đối với pHT43-amyQ, mẫu chứng âm thu ở 6 giờ (pHT43)

So sánh sự biểu hiện protein ngoại bào ở hai chủng *B. subtilis*, ta thấy, chủng *B. subtilis* WB800N (Hình 2B) cho vạch protein mục tiêu đậm hơn so với chủng *B. subtilis* 1012 (Hình 2A), rõ nhất ở mẫu 6 giờ sau cảm ứng. Chứng tỏ, lượng α -amylase tạo ra từ *B. subtilis* WB800N nhiều hơn so với *B. subtilis* 1012. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với hoạt tính α -amylase biểu hiện trên đĩa thông qua vòng phân giải trên đĩa tinh bột (Hình 1). Tuy nhiên, khi so sánh

tỷ lệ α -amylase trên tổng số protein tiết thì *B. subtilis* 1012 lại cho kết quả tốt hơn với 30% (AlphaEaseFC); trong khi, ở *B. subtilis* WB800N thì tỷ lệ này chỉ đạt khoảng 25% (AlphaEaseFC) mặc dù lượng protein mục tiêu biểu hiện nhiều hơn *B. subtilis* 1012. Như vậy việc loại bỏ tâm protease ngoại bào ở *B. subtilis* WB800N giúp hạn chế phân cắt protein mục tiêu, nhưng cũng làm tích tụ nhiều protein tiết khác trong môi trường

THẢO LUẬN

Những nghiên cứu đầu tiên về việc biểu hiện protein α -amylase trong *B. subtilis* được thực hiện bởi Palva vào năm 1982. Gene *amyQ* từ *B. amyloliquefasciens* được phân lập và chèn vào plasmid pUB110 (Keggins *et al.*, 1978), kết quả hình thành plasmid pKTH10 cho khả năng biểu hiện α -amylase tăng gấp 2500 lần so với chủng *B. subtilis* Marburg và gấp 5 lần so với *B. amyloliquefasciens* (Palva, 1982). Đây là một plasmid sao chép cuộn tròn có tiềm năng không ổn định về cấu trúc (Schumann, 2007), với số lượng bản sao là 50 plasmid/tế bào và tự cảm ứng. Một số nghiên cứu gần đây của chúng tôi cho thấy, việc áp dụng promoter *Pgrac* vào các plasmid biểu hiện tiết α -amylase cho kết quả tương đương với pKTH10 (Phan *et al.*, 2006). Tuy nhiên, so với pKTH10 có gốc từ pUB110 thì pHT01 có những ưu điểm vượt trội: (i) cơ chế sao chép theta, giúp ổn định về mặt cấu trúc trong tế bào, (ii) số lượng bản sao 4 – 6 plasmid/tế bào, hạn chế biểu hiện nền và (iii) đặc điểm cảm ứng bằng IPTG cho phép kiểm soát tốt việc biểu hiện protein mục tiêu. Với ưu điểm này, *Pgrac* đã cho thấy tiềm năng ứng dụng hiệu quả trong việc điều hòa biểu hiện protein tái tổ hợp, nhất là những protein gây độc cho tế bào và giúp biểu hiện protein mục tiêu ở những thời điểm mong muốn.

Việc sử dụng chủng đột biến *B. subtilis* WB800N cho phép protein mục tiêu biểu hiện nhiều hơn trong môi trường nuôi cấy do ít bị ảnh hưởng bởi protease ngoại bào, cho thấy hiệu quả sử dụng của chủng đột biến này. Tuy nhiên, việc giảm tiết các protein khác (ngoài protein mục tiêu) ra môi trường có ý nghĩa rất quan trọng khi tinh sạch sau biểu hiện. Do đó, một hạn chế của *B. subtilis* WB800N là cho phép tích tụ nhiều protein ngoại bào khác, điều này làm giảm phần trăm protein mục tiêu trên tổng số protein tiết. Mặc dù vậy, với khả năng biểu hiện tiết tới lên đến 25% tổng protein ngoại bào thì *B. subtilis* WB800N sẽ là một chủng chu tiềm năng trong việc biểu hiện protein mục tiêu dưới dạng tiết, đặc biệt là những protein dễ bị phân cắt bởi protease ngoại bào. Trong khi đó, các chủng biểu hiện protease ngoại bào như *B. subtilis* 1012 lại thích hợp cho việc biểu hiện các protein tái tổ hợp tương đối bền với các protease này.

KẾT LUẬN

Từ kết quả khảo sát hoạt tính α -amylase trên đĩa

thạch và sự biểu hiện trong môi trường lỏng thể hiện trên SDS-PAGE, có thể kết luận như sau. Plasmid pHT01 chứa promoter *Pgrac* là một hệ vector biểu hiện mạnh cho *B. subtilis* giúp điều hòa biểu hiện gene mục tiêu một cách hiệu quả lên đến hơn 25% tổng protein tiết. Plasmid pHT01 có thể sử dụng cùng với chủng *B. subtilis* WB800N trong việc biểu hiện tiết protein mục tiêu, đặc biệt phù hợp cho những protein dễ bị thủy phân bởi protease ngoại bào của *B. subtilis*.

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

- Bongers R, Veening J, Van Wieringen M, Kuipers O, Kleerebezem M (2005) Development and Characterization of a Subtilin-Regulated Expression System in *Bacillus subtilis*: Strict Control of Gene Expression by Addition of Subtilin. *Appl Environ Microbiol* 71: 8818-8824.
- Chen P, Shaw J, Chao Y, David Ho T, Yu S (2010) Construction of Chromosomally Located T7 Expression System for Production of Heterologously Secreted Proteins in *Bacillus subtilis*. *J Agric Food Chem* 58: 5392-5399.
- Gressendorfer M, Hillen W (1990) Regulated expression of heterologous genes in *Bacillus subtilis* using the Tn10 encoded regulatory elements. *Appl Microbiol Biotechnol* 33: 657-663.
- Harwood CR (1992) *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends Biotechnol* 10: 247-256.
- Keggins KM, Lovett PS, Duvall EJ (1978) Molecular cloning of genetically active fragments of *Bacillus* DNA in *Bacillus subtilis* and properties of the vector plasmid pUB110. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 1423-1427.
- Kim L, Mogk A, Schumann W (1996) A xylose-inducible *Bacillus subtilis* integration vector and its application. *Gene* 181: 71-76.
- Nguyen HD, Phan TT, Schumann W (2011) Analysis and application of *Bacillus subtilis* sortases to anchor recombinant proteins on the cell wall. *Amb Express* 1: 22.
- Nguyen HD, Phan TTP, Schumann W (2007) Expression vectors for the rapid purification of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol* 55: 89-93.
- Nicholson WL, Chambliss GH (1985) Isolation and characterization of a *cis*-acting mutation conferring catabolite repression resistance to alpha-amylase synthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 161: 875-881.

- Palva I (1982) Molecular cloning of alpha-amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* and its expression in *B. subtilis* Gene 19: 81-87.
- Petri W, Page R (2007) Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. *Protein Expr Purif* 51: 1-10.
- Petsch D, Anspach FB (2000) Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotechnol* 76: 97-119.
- Phan TTP, Nguyen HD, Schumann W (2006) Novel plasmid-based expression vectors for intra- and extracellular production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Protein Expr Purif* 46: 189-195.
- Phan TTP, Nguyen HD, Schumann W (2012) Development of a strong intracellular expression system for *Bacillus subtilis* by optimizing promoter elements. *J Biotechnol* 157: 167-172.
- Phan TTP, Schumann W (2007) Development of a glycine-inducible expression system for *Bacillus subtilis*. *J Biotechnol* 128: 486-499.
- Saito H, Shibata T, Ando T (1979) Mapping of genes determining nonpermissiveness and host-specific restriction to bacteriophages in *Bacillus subtilis* Marburg. *Mol Gen Genet* 170: 117-122.
- Schallmeyer M, Singh A, Ward OP (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol* 50: 1-17.
- Schumann W (2007) Production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Adv Appl Microbiol* 62: 137-189.
- Wu SC, Yeung JC, Duan Y, Ye R, Szarka SJ, Habibi HR, Wong SL (2002) Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*: effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production. *Appl Environ Microbiol* 68: 3261-3269.
- Yamamoto H, Murata M, Sekiguchi J (2000) The Cu^{2+} two-component system regulates the expression of the Mg-citrate transporter in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 37: 898-912.
- Yansura DG, Henner DJ (1984) Use of the *Escherichia coli* lac repressor and operator to control gene expression in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 439-443.

STUDY ON SECRETIONAL EXPRESSION OF α -AMYLASE REPORTER IN *BACILLUS SUBTILIS* WB800N USING VECTOR pHT01

Phan Thi Phuong Trang, Nguyen Hoai Nam, Tran Linh Thuoc, Nguyen Duc Hoang*

University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City

SUMMARY

The appearance of the first commercial plasmid pHT01 promotes the study for inducible over-expression of recombinant protein in *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*). Most of researches published relating to this plasmid used *B. subtilis* 168 derivatives, such as 1012 strain, but not with WB800N – eight-fold protease-deficient strain. To explore the possibility to use plasmid pHT01 with *B. subtilis* WB800N for secretional over-expression of recombinant protein, we used secretional reporter protein, α -amylase encoded by *amyQ* from *Bacillus amyloliquefaciens*. Plasmid pHT43-*amyQ* was constructed from pHT01 and used to investigate the secretional expression of α -amylase in both *B. subtilis* 1012 and *B. subtilis* WB800N. The results showed that α -amylase could be produced efficiently in both strains, in which the amount of the reporter from WB800N was higher than that from 1012. This result suggests that plasmid pHT01 can be used with *B. subtilis* WB800N for secretional expression of recombinant protein.

Keywords: *amyQ*, *Bacillus subtilis*, plasmid pHT, pHT01, promoter P_{grac}, WB800N

* Author for correspondence: E-mail: ndhoang@hcmus.edu.vn