



Bài báo nghiên cứu

KHẢO SÁT SỰ ẢNH HƯỞNG CỦA SỐ LƯỢNG HISTIDINE TRONG ĐUÔI DUNG HỢP Ở ĐẦU C LÊN SỰ BIỂU HIỆN TIẾT ENDOGLUCANASE B TRONG *BACILLUS SUBTILIS*

Lê Dương Vương^{1,2}, Đặng Thị Kim Ngân¹,
Trương Thông¹, Phan Thị Phương Trang¹, Nguyễn Đức Hoàng^{1*}

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG TPHCM

²Trường Đại học Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh

*Tác giả liên hệ: Nguyễn Đức Hoàng – Email: ndhoang@hcmus.edu.vn

Ngày nhận bài: 29-5-2019; ngày nhận bài sửa: 22-6-2019; ngày duyệt đăng: 11-7-2019

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chủng chủ *Bacillus subtilis* và gen chỉ thị *celB* được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của số lượng Histidine trong đuôi dung hợp ở đầu C lên sự biểu hiện tiết Endoglucanase B. Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng *B. subtilis* 1012 phù hợp cho sự biểu hiện *CelB* hơn khi so với chủng *B. subtilis* WB800N. Đuôi 6His có ảnh hưởng làm giảm sự biểu hiện tiết *CelB* nhiều hơn hai đuôi 5His và 4His. Ngược lại, *CelB*-6His cho khả năng bám hạt Ni-NTA tốt hơn, ít thất thoát nhất (4,78%) trong khi *CelB*-4His lại có sự rò rỉ khi tinh chế bằng hạt Ni-NTA ở mức cao nhất (16,1%).

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, Histidine, Endoglucanase B, Pgrac212, đuôi dung hợp.

1. Giới thiệu

Việc sử dụng các đuôi dung hợp đã trở nên khá phổ biến với nhiều ứng dụng phong phú trong công nghệ sản xuất protein tái tổ hợp (Terpe, 2003). Đuôi dung hợp giúp làm đơn giản hóa quy trình phát hiện và tinh sạch protein. Cùng với sự phát triển của công nghệ sinh học, giá trị sử dụng của các đuôi dung hợp ngày càng tăng bởi khả năng bảo vệ protein mục tiêu khỏi sự phân cắt của protease, giúp protein mục tiêu tan tốt hơn, tăng hiệu quả tổng hợp protein và hỗ trợ tốt quá trình gấp cuộn.

Hiện nay, His-tag (polyhistidine) đang nổi lên là công cụ phổ biến nhất để thu nhận protein nhận. Đây là một công cụ có nhiều ưu điểm như: (i) kích thước đuôi dung hợp nhỏ (kích thước khoảng 0,84 kDa đối với 6His), hạn chế tính miễn dịch so với các đuôi tinh chế khác có kích thước lớn hơn và không cần được loại bỏ trong các quá trình sử dụng protein sau tinh sạch, (ii) một số lượng lớn vector thương mại được thiết kế cho sự biểu

Cite this article as: Le Duong Vuong, Dang Thi Kim Ngan, Truong Thong, Phan Thi Phuong Trang, & Nguyen Duc Hoang (2019). The impact of the amount of Histidine in C-terminal fusion-tag on the secretion of Endoglucanase B in *Bacillus subtilis*. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 16(9), 323-334.

hiện protein có gắn His-tag đã được các nhà nghiên cứu sử dụng và (iii) tương tác của His-tag không phụ thuộc vào cấu trúc của đuôi dung hợp, do đó protein tái tổ hợp có His-tag có thể được tinh chế dưới điều kiện biến tính (Goel et al., 2000), (Waugh, 2005). Cấu trúc của đuôi dung hợp polyhistidine (bao gồm vị trí, trình tự, độ dài) có thể ảnh hưởng đến việc biểu hiện protein ở nhiều mức độ khác nhau gồm: khả năng biểu hiện, khả năng tiết, khả năng bám vào ion kim loại được cố định, cấu trúc bậc ba của protein, cấu trúc tinh thể, khả năng tan và hoạt tính của protein (Block et al., 2009). Nếu số lượng Histidine trong đuôi dung hợp quá ít thì ái lực của protein mục tiêu với ion kim loại giảm đi làm mất khả năng gắn chọn lọc do chịu sự cạnh tranh của các protein tạp có chứa Histidine. Trong một số trường hợp, việc gia tăng số lượng Histidine trong đuôi dung hợp sẽ làm tăng độ tinh sạch của protein mục tiêu. Tuy nhiên, cũng được khuyến cáo sử dụng đuôi dung hợp polyhistidine với ít Histidine để làm giảm tối thiểu sự ảnh hưởng của đuôi dung hợp lên chức năng protein (Bornhorst, & Falke, 2000). Ngoài ra, trong biểu hiện tiết, điện tích dương của Histidine trong đuôi dung hợp cũng có thể gây trở ngại cho quá trình dung hợp protein qua màng. Trong nghiên cứu này, đuôi dung hợp polyhistidine được gắn vào đầu C của protein tiết để giảm sự can thiệp của đuôi dung hợp lên màng trong quá trình vận chuyển (Block et al., 2009).

Trong nghiên cứu này, sự ảnh hưởng của số lượng Histidine trong đuôi dung hợp lên sự biểu hiện tiết và quá trình tinh chế được tiến hành trên *B. subtilis* bằng cách sử dụng gen chỉ thị *celB*. Gen chỉ thị *celB* mã hóa cho protein Endoglucanase B (CelB), một trong những thành phần chủ yếu của phức hệ Cellulosome có nguồn gốc từ *C. thermocellum*. Trong một nghiên cứu đã được công bố, CelB được sử dụng làm chỉ thị để khảo sát khả năng biểu hiện tiết của plasmid pHT43 mang promoter *Pgrac212* trên *B. subtilis* (Phan, 2007). Bên cạnh đó, chủng chủ *B. subtilis* được sử dụng là do đây là chủng vi sinh vật mô hình cho sự biểu hiện ngoại bào, được FDA công nhận là GRAS (Generally Regarded As Safe), không sinh nội độc tố và có khả năng biểu hiện tiết lên đến 20-25 g/l dịch lên men (Schallmeyer, Singh, & Ward, 2004).

2. Vật liệu & Phương pháp

2.1. Vật liệu

Chủng *E. coli* OmniMAX (InvitrogenTM), Chủng *B. subtilis* 1012 tự nhiên, chủng *B. subtilis* WB800N (Bảng 1); các plasmid pHT1253, pHT1254, pHT1255, pHT43, pNDH37-*celB* (Bảng 2), các môi đặc hiệu (Bảng 3) được cung cấp bởi Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học.

Bảng 1. Các chủng chủ để tạo dòng và biểu hiện

Chủng chủ	Đặc điểm bộ gen	Sử dụng
<i>E. coli</i> OmniMAX	(F' { <i>proAB+</i> <i>lacIq</i> <i>lacZ</i> ΔM15 <i>Tn10</i> (TetR) Δ(<i>ccdAB</i>)} <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ80(<i>lacZ</i>)ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>endA1</i> <i>recA1supE44</i> <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>tonA</i> <i>panD</i>).	Tạo dòng
<i>B. subtilis</i> 1012	<i>leuA8</i> <i>metB5</i> <i>trpC2</i> <i>hsdRM1</i>	Biểu hiện protein
<i>B. subtilis</i> WB800N	<i>nprE</i> <i>aprE</i> <i>epr</i> <i>bpr</i> <i>mpr</i> :: <i>ble</i> <i>nprB</i> :: <i>bsr</i> . <i>vpr</i> <i>wprA</i> :: <i>hyg</i> <i>cm</i> :: <i>neo</i> ; NeoR) đã bị đột biến mất 8 protease ngoại bào	Biểu hiện protein

Môi trường Luria Broth (LB) được sử dụng để nuôi cấy các chủng với kháng sinh thích hợp như Ampicillin (Amp) nồng độ cuối 100 µg/ml và Chloramphenicol (Cm) nồng độ cuối 10 µg/ml.

Bảng 2. Các plasmid được dùng trong nghiên cứu

Plasmid	Cấu trúc	Mục tiêu sử dụng
pHT1283	<i>Pgrac-ssAmyQ-celB</i> -GSHGHHHHH	Nghiên cứu này
pHT1284	<i>Pgrac-ssAmyQ-celB</i> -GSHGSHHHH	Nghiên cứu này
pHT1285	<i>Pgrac-ssAmyQ-celB</i> -GSHGSHSHGH	Nghiên cứu này
pHT43	<i>Pgrac-ssAmyQ</i>	Chứng âm
pNDH37- <i>celB</i>		Thu gen <i>celB</i> (T. T. P. Phan, Nguyen, & Schumann, 2006)
pHT1253	<i>Pgrac-ssAmyQ</i> -MCS-GSHGHHHHH	Tạo pHT1283
pHT1254	<i>Pgrac-ssAmyQ</i> -MCS-GSHGSHHHH	Tạo pHT1284
pHT1255	<i>Pgrac-ssAmyQ</i> -MCS-GSHGSHSHGH	Tạo pHT1285

Bảng 3. Các Primer (trình tự môi) được dùng trong nghiên cứu

Tên Primer	Cấu trúc Primer	Mục tiêu sử dụng
ON917	AGCATCAGCAGGATCCGAAGGGTCA TATGCTGATTTGG	Thu gen <i>celB</i>
ON918B	TGTCCATGTGATCCGCTTTTATACGG CAACTCACTTATGCTACGC	Thu gen <i>celB</i> PCR kiểm tra cho pHT1283, pHT1284, pHT1285
ON653	ACCGGAATTAGCTTGGTACCAGCTAT TG	PCR kiểm tra cho pHT1283, pHT1284, pHT1285
ON707	AAAGGAGGAAGGATCAATGAGAGG AAGCA	Giải trình tự cho pHT1283, pHT1284, pHT1285
ON314	TGTTTCAACCATTTGTTCCAGGT	Giải trình tự cho pHT1283, pHT1284, pHT1285

2.2. Phương pháp

2.2.1. Thiết kế các vector biểu hiện CelB với đuôi dung hợp His-tag

Đầu tiên, gen *celB* được thu nhận bằng phản ứng PCR từ plasmid pNDH37-*celB* với cặp mồi ON917/ON918B (Bảng 3) và *Pfu* polymerase. Sản phẩm PCR này được cắt đồng thời với ba plasmid khuôn pHT1253, pHT1254, pHT1255 (có sẵn trình tự tín hiệu tiết *sSamyQ* nằm ở đầu N của vùng MCS và lần lượt chứa các trình tự mã hóa các đuôi dung hợp có từ 4 đến 6 Histidine) (Bảng 2) bởi enzyme cắt giới hạn *Bam*HI/*Aat*II. Các sản phẩm cắt của các plasmid khuôn này lần lượt được nối với gen *celB* bằng T4 DNA ligase để tạo plasmid mục tiêu pHT1283, pHT1284, pHT1285 (có cấu trúc như Bảng 2).

Các sản phẩm nối này được biến nạp vào *E. coli* OmniMAX bằng phương pháp hóa biến nạp (Phan, Huynh, Truong, & Nguyen, 2017) và sàng lọc trên môi trường LB-Agar có Amp (100 µg/ml). Các dòng *E. coli* OmniMAX chứa các plasmid mục tiêu được kiểm tra bằng phương pháp PCR khuôn lạc với cặp mồi ON653/ON918B (Bảng 3) và *Taq* polymerase. Các plasmid mục tiêu được thu nhận, tách chiết từ các dòng *E. coli* OmniMAX có kết quả PCR dương tính và gửi đi giải trình tự với cặp mồi ON707/ ON314 (Bảng 3) tại Công ti Macrogen.Inc (Hàn Quốc). Các plasmid cho trình tự tương đồng với kết quả lí thuyết 100 % sẽ được biến nạp vào 2 chủng biểu hiện *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N (Bảng 1) theo quy trình biến nạp tự nhiên trên *B. subtilis* (Phan et al., 2017).

2.2.2. Kiểm tra sự biểu hiện tiết CelB trên môi trường rắn

Các dòng *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N chứa các plasmid mục tiêu pHT1283, pHT1284, pHT1285 và chúng âm pHT43 được cấy sang các đĩa thạch LB-Cm-Agar chứa CMC 0,5% và có các nồng độ cảm ứng IPTG khác nhau (0 mM; 0,001 mM; 0,01 mM; 0,1 mM; 0,5 mM và 1 mM). Các đĩa khảo sát được ủ ở 30°C trong 36 giờ. Sau đó, sử dụng thuốc thử Congo Red 1% để kiểm tra hoạt tính endoglucanase B dựa trên vòng phân giải CMC do vùng đĩa thạch có cơ chất CMC đã bị phân hủy bởi CelB sẽ không bắt màu với dung dịch Congo Red 1%.

2.2.3. Kiểm tra sự biểu hiện tiết CelB trên môi trường lỏng

Các chủng dùng trong khảo sát được tiến hành nuôi trong elern chứa 20 ml môi trường LB-Cm đến khi OD_{600 nm} đạt giá trị từ 0,8-1 thì tiến hành cảm ứng biểu hiện protein bằng IPTG. Mẫu protein CelB được thu nhận trong dịch nổi sau khi li tâm 13000 xg trong 10 phút. Các thông số tiến hành trong khảo sát này bao gồm: (i) nhiệt độ nuôi cấy 30°C & 37°C; (ii) Nồng độ chất cảm ứng IPTG: 0; 0,01; 0,1; 1 mM; (iii) Thời gian thu mẫu sau cảm ứng: 2, 4, 6, 8, 10 giờ. Sự biểu hiện tiết CelB được đánh giá bằng phương pháp đo hoạt tính DNS (dinitrosalicylic acid assay).

Phương pháp đo hoạt tính DNS

Hoạt tính endoglucanase của CelB được đo theo quy trình biến đổi từ quy trình chuẩn của IUPAC dựa trên lượng đường khử được tạo ra khi so sánh với đường chuẩn

glucose (Mandels, Andreotti, & Roche, 1976). 250 μ l cơ chất CMC pha trong đệm phosphate được ủ cùng với 250 μ l dịch enzyme ở 55°C, 1 giờ trong eppendorf. Sau đó, 500 μ l DNS 1% được thêm vào eppendorf, tiếp tục ủ nhiệt ở 95°C trong 5 phút để ngừng phản ứng cắt của enzyme và xác định giá trị OD_{540 nm} (giá trị thể hiện số góc đường khử sau phản ứng thủy phân của CelB).

Số góc đường khử trước phản ứng thủy phân (trong môi trường nuôi cấy hay trong cơ chất CMC) được xác định bằng phương pháp tương tự khi sử dụng với mẫu Blank tương ứng (dịch enzyme đã được bất hoạt bằng cách ủ ở 95°C trong 10 phút). Số lượng glucose tương ứng với số góc đường khử tạo ra do phản ứng thủy phân của CelB với cơ chất CMC được xác định khi tính toán dựa trên hiệu của OD_{540 nm} và giá trị OD_{Blank} tương ứng và đường chuẩn đường khử được xây dựng dựa trên giá trị OD_{540 nm} của các nồng độ glucose khác nhau theo phương pháp DNS. Lượng đường khử (mg/ml) thu nhận được quy đổi ra đơn vị hoạt tính enzyme (IU) theo định nghĩa: lượng enzyme cần thiết để tạo ra 0,18 μ g (ứng với 1 nmol) đường khử glucose tương đương trong 1 phút. 1 IU = 1 μ mol glucose/min = 0,18 mg/min. Do tỉ lệ enzyme: CMC là 1: 1 nên áp dụng công thức ta có: 1 mg glucose/ml = 0,0925 IU (do ủ 60 phút) = 92,5 mIU (Mandels et al., 1976), (Eveleigh, Mandels, Andreotti, & Roche, 2009).

2.2.4. Tinh chế với hạt Ni-NTA

Áp dụng kết quả khảo sát, các enzyme CelB dung hợp đuôi Histidine được biểu hiện với điều kiện tối ưu và tiến hành tinh chế với hạt Ni-NTA. để khẳng định khả năng tinh chế của các đuôi His dung hợp, đồng thời là để kiểm tra tính đúng của số lượng His trong các đuôi dung hợp ở từng plasmid.

Protein CelB được gắn lên hạt Ni-NTA dựa trên ái lực của đuôi Histidine với Ni²⁺. Dịch protein (1 ml) được thêm vào eppendorf có chứa 200 μ l hạt Ni-NTA và lắc ở tốc độ 100 vòng/phút trong 30 phút. Sau đó, mẫu được li tâm 7000 xg trong 5 phút để loại dịch nổi. Các protein tạp không có đuôi Histidine (không có khả năng gắn vào hạt Ni-NTA) còn sót lại được loại bỏ bằng phương pháp rửa mẫu với 1 ml dung dịch EBW (30 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM NaCl). Lắc nhẹ ở tốc độ 100 vòng/phút trong 30 phút. Li tâm 7000 xg trong 5 phút, loại dịch nổi. Công đoạn rửa này được thực hiện 2 lần.

Protein CelB có gắn đuôi Histidine được thu nhận bằng cách sử dụng buffer dung li là 500 μ l dung dịch EBW có nồng độ imidazole lần lượt là 5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM, 80 mM và 250 mM. Lắc ở tốc độ 100 vòng/phút trong 30 phút. Li tâm 7000 xg trong 5 phút, thu dịch nổi. Phân tích các mẫu protein dung li ở từng phân đoạn bằng phương pháp đo hoạt tính DNS.

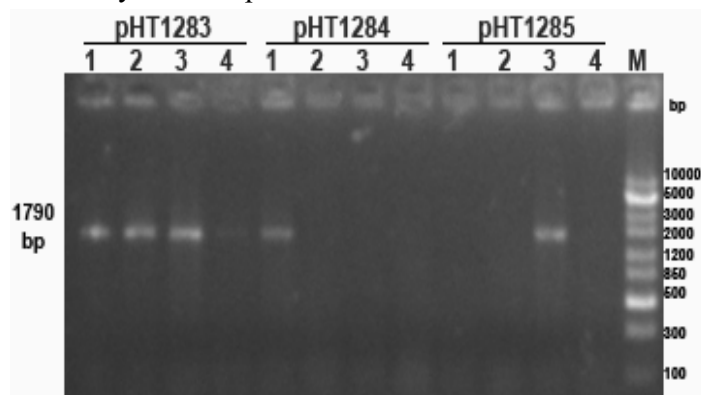
2.2.5. Xử lí số liệu

Các thí nghiệm đo hoạt tính được lặp lại 3 lần. Các kiểm định ANOVA một chiều được thực hiện bằng phần mềm Minitab17.

3. Kết quả và biện luận

3.1. Tạo dòng các vector và chủng *B. subtilis* biểu hiện *CelB* có đuôi dung hợp Histidine

Sau khi sàng lọc bằng môi trường LB có kháng sinh, các dòng tế bào *E. coli* OmniMax mang các plasmid pHT1283, pHT1284, pHT1285 được kiểm tra bằng phương pháp PCR khuẩn lạc với cặp mồi ON653 và ON918B. Kết quả điện di gel Agarose của các sản phẩm PCR (Hình 2) cho thấy ở các plasmid đều chọn được khuẩn lạc có vạch tương đồng với kích thước lý thuyết 1769 bp.

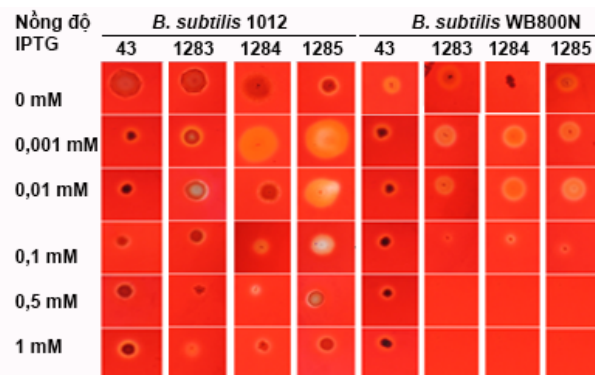


Hình 2. Kết quả PCR sàng lọc các dòng *E. coli* OmniMAX mang pHT1283, pHT1284, pHT1285 bằng cặp mồi đặc hiệu ON653/ ON918B

Các dòng *E. coli* OmniMAX có kết quả PCR dương tính này được nuôi tăng sinh để tách chiết plasmid và giải trình tự. Kết quả giải trình tự (dữ liệu không được trình bày) là tương đồng 100% với trình tự lý thuyết, chứng tỏ đã tạo dòng được 3 plasmid pHT1283, pHT1284, pHT1285 với vùng trình tự *celB* có gắn trình tự đuôi tinh chế Histidine. Các plasmid này lần lượt được biến nạp vào 2 chủng *B. subtilis* 1012 và WB800N để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Kết quả kiểm tra sự biểu hiện tiết *CelB* trên môi trường rắn

Phương pháp tạo vòng phân giải CMC với thuốc nhuộm Congo Red là phương pháp đơn giản để phát hiện khả năng tiết các protein thuộc nhóm cellulase của chủng vi sinh vật. Vòng phân giải càng lớn cho thấy chủng tiết protein có hoạt tính glucanase ra môi trường càng nhiều. Kết quả thí nghiệm cho thấy (Hình 3), so với chứng âm, trên cả hai chủng khảo sát với tất cả các plasmid tái tổ hợp đều cho vòng phân giải CMC lớn hơn. Vòng phân giải nhỏ xung quanh chứng âm có thể giải thích là do có sự tồn tại một lượng nhỏ của enzyme có hoạt tính glucanase trong hệ protein của chủng *B. subtilis* tự nhiên.

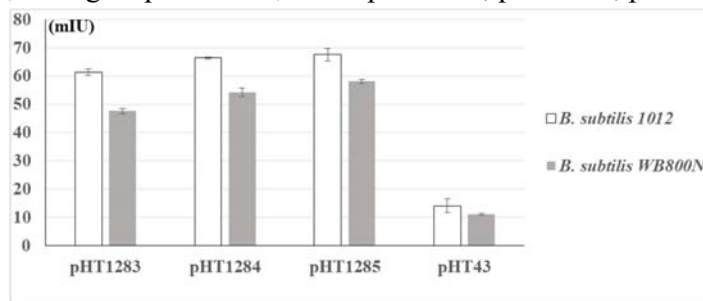


Hình 3. Kết quả khảo sát khả năng biểu hiện tiết CelB trên môi trường rắn của hai chủng chủ *B. subtilis* 1012 và WB800N lần lượt chứa các plasmid pHT1283, pHT1284, pHT1285, pHT43 (chứng âm)

Bên cạnh đó, đường kính vòng phân giải của các khuẩn lạc mang ba plasmid mục tiêu pHT1283, pHT1284, pHT1285 đạt tối đa ở nồng độ 0,001 mM và 0,01 mM. Ở các nồng độ còn lại, đường kính khuẩn lạc và vòng phân giải giảm dần, ngược chiều với sự gia tăng nồng độ IPTG. Đối với các chủng *B. subtilis* chứa các plasmid mục tiêu, ở nồng độ từ 0,1 mM trở lên, hầu như chỉ quan sát được khuẩn lạc rất nhỏ hoặc không tồn tại khuẩn lạc. Điều này cho thấy, sự gia tăng tiết CelB khi tăng nồng độ IPTG đã ảnh hưởng mạnh đến sự phát triển của tế bào *B. subtilis*.

3.3. Kết quả kiểm tra sự biểu hiện tiết CelB trên môi trường lỏng

Các kết quả đo hoạt tính CelB được xác định bằng phương pháp DNS với tất cả các điều kiện nhiệt độ (30°C và 37°C), nồng độ IPTG cảm ứng (0; 0,01; 0,1; 1 mM), thời gian thu mẫu (2, 4, 6, 8, 10 giờ sau cảm ứng) (dữ liệu không được trình bày) và dùng để xác định điều kiện tối ưu để biểu hiện CelB của từng chủng *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N lần lượt mang ba plasmid mục tiêu: pHT1283, pHT1284, pHT1285.



Hình 4. Hoạt tính cellulase từ dịch chiết môi trường nuôi cấy các chủng chủ *B. subtilis* 1012 và WB800N lần lượt chứa các plasmid pHT1283, pHT1284, pHT1285, pHT43 (-)

Kết quả hoạt tính của các mẫu enzyme (Hình 4 và Bảng 4) ở mức chấp nhận được (hơn hẳn chứng âm chứa pHT43) và cho thấy có sự biểu hiện CelB ở *B. subtilis* 1012 khi so với ở *B. subtilis* WB800N. Sử dụng kiểm định ANOVA một chiều bằng chương trình Minitab17 với H_0 : không có sự khác biệt giữa *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N (nghĩa là chủng chủ không ảnh hưởng đến khả năng biểu hiện tiết của CelB), H_1 : sự biểu hiện CelB ở *B. subtilis* 1012 lớn hơn ở *B. subtilis* WB800N thì nhận được giá trị $P = 0,000 < 0,05$ (tức là sai số 5%), tức là bác bỏ giả thuyết H_0 . Điều này có nghĩa là về mặt thống kê ở độ tin cậy là 95% thì sự biểu hiện CelB ở *B. subtilis* 1012 có sự khác biệt và mạnh hơn *B. subtilis* WB800N.

Bảng 4. Kết quả hoạt tính CelB khi tiến hành khảo sát trên môi trường lỏng của hai chủng chủ *B. subtilis* 1012 và WB800N lần lượt chứa các plasmid pHT1283, pHT1284, pHT1285, pHT43 (chứng âm)

Chủng chủ	Plasmid	Nhiệt độ	IPTG (mM)	Thời gian cảm ứng (giờ)	Hoạt tính (mIU)	Mức xếp hạng Turkey 's *
<i>B. subtilis</i> 1012	pHT1283	37°C	0,1	6	61,36 ± 1,17	B
	pHT1284	37°C	0,01	8	66,33 ± 0,33	A
	pHT1285	37°C	0,01	10	67,51 ± 2,17	A
	pHT43	37°C	0,1	8	14,12 ± 2,5	E
<i>B. subtilis</i> WB800N	pHT1283	37°C	0,1	6	47,57 ± 0,97	D
	pHT1284	37°C	0,01	8	54,3 ± 1,5	C
	pHT1285	37°C	0,1	10	58,06 ± 0,66	BC**
	pHT43	37°C	0,1	8	11,15 ± 0,28	E

*: dựa trên phân tích ANOVA một chiều

**BC: nghĩa là vừa thuộc mức B vừa thuộc mức C.

Bên cạnh đó, cũng dựa vào các kết quả thu được (Hình 4 và Bảng 4), ta có thể phân tích mức độ ảnh hưởng của số lượng Histidine trong đuôi dung hợp lên khả năng biểu hiện của CelB ở *B. subtilis*. Tiến hành phân tích ANOVA một chiều với kiểm định Turkey sai số được thiết lập là $\alpha = 5 \%$. Giả thiết được thiết lập với H_0 : không có sự khác biệt về hoạt tính giữa các mẫu protein dung hợp, H_1 : có sự khác biệt về hoạt tính giữa các mẫu protein dung hợp, H_0 sẽ bị bác bỏ khi giá trị $P < \alpha = 0,05$; * là giá trị trung bình nằm giữa khoảng biến thiên các giá trị hoạt tính đo được. Kết quả phân tích cho thấy $P = 0,000$ nhỏ hơn 0,01 chứng tỏ giả thuyết H_1 được chấp nhận. Điều này có nghĩa là có sự khác biệt về hoạt tính giữa các mẫu protein dung hợp, chứng tỏ ảnh hưởng của số lượng Histidine (từ 4 đến 6) trong đuôi dung hợp lên sự tiết CelB là khác nhau. Theo kiểm định Tukey HSD, các biến lớn nhất được xếp là khoảng giá trị A, rồi nhỏ hơn với B, C, D... Kiểm định này được xây dựng bằng cách lần lượt so sánh giá trị trung bình của các biến với nhau. Hai biến nằm trong 2 khoảng giá trị khác nhau nếu trị tuyệt đối của hiệu giá trị trung bình của 2 biến lớn

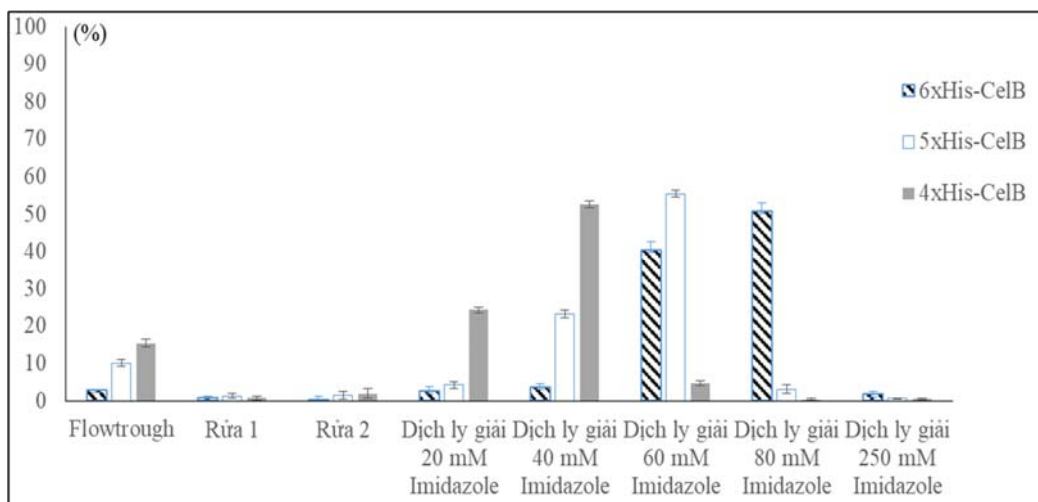
hơn giá trị $q_{crit}\sqrt{MSw/n}$ với MSw là phương sai trung bình của các biến, n là số giá trị trong mỗi biến, q_{crit} được xác định bằng bảng phân phối Student. Giá trị q_{crit} phụ thuộc vào giá trị sai số α , số biến phân tích k, giá trị n (do bậc tự do của bảng phân phối Student $df = n-k$).

Kết quả phân tích (Bảng 4) cho thấy, với sai số 5%, mẫu CelB-4His biểu hiện bởi pHT1285 và mẫu CelB-5His biểu hiện bởi pHT1284 cho sự biểu hiện vượt trội ở mức A (ở *B. subtilis* 1012) và mức C (ở *B. subtilis* WB800N). Còn đối với mẫu CelB-6His, kết quả hoạt tính thu được chỉ đạt mức thấp nhất trong ba loại mẫu chứa protein dung hợp (loại B với *B. subtilis* 1012 và loại D ở *B. subtilis* WB800N). Điều này chứng tỏ ảnh hưởng của số lượng Histidine (từ 4-5) lên sự biểu hiện tiết Endoglucanase B là tương đương nhau và đuôi 6His có tác động làm giảm sự tiết CelB nhiều nhất trong ba loại đuôi dung hợp. Trong khi đó, chủng nấm chứa pHT43 chỉ được xếp ở bậc nhỏ nhất là loại E ở cả 2 chủng chủ.

3.4. Kết quả tinh chế với hạt Ni-NTA

Quá trình tinh chế cho thấy các protein tái tổ hợp CelB có gắn đuôi Histidine có khả năng gắn hạt Ni-NTA, chứng tỏ có thể sử dụng liên kết Ni^{2+} và Histidine để thu được CelB tinh sạch. Các kết quả đo hoạt tính (tính theo % dịch ban đầu) của các phân đoạn trong quá trình tinh chế CelB bằng hạt Ni-NTA được biểu thị ở Hình 5. Trong phân đoạn gắn CelB-His với hạt Ni-NTA, kết quả cho thấy hoạt tính endoglucanase trong dịch nổi (phân đoạn Flowthrough) của mẫu protein có đuôi 4His (từ pHT1285) lớn hơn mẫu protein có đuôi 5His (pHT1284), mẫu có đuôi dung hợp 6His (pHT1283) cho hoạt tính thấp nhất chứng tỏ mẫu CelB-6His cho khả năng bám hạt Ni-NTA lớn hơn mẫu CelB-5His, thấp nhất là mẫu CelB-4His. Kết quả này phù hợp với kết quả lý thuyết là nếu đuôi dung hợp có số lượng His càng ít thì khả năng bám hạt càng kém, hoạt tính enzyme trong dịch Flowthrough càng cao. Kết quả này cũng cho thấy sự thất thoát do khả năng bám kém của protein dung hợp đuôi 4His > 5His > 6His. Trong đó, mẫu CelB-6His cho sự thất thoát thấp hơn 5% trong khi các mẫu CelB-5His cho sự thất thoát lớn hơn 10% và lớn hơn 15% đối với mẫu CelB-4His,

Trong các phân đoạn li giải với các nồng độ imidazole khác nhau thì mẫu CelB có đuôi dung hợp 4His (biểu hiện bởi pHT1285) tập trung li giải ở 2 nồng độ 20 mM và 40 mM. Mẫu CelB có đuôi dung hợp 5His (biểu hiện bởi pHT1284) dung li chủ yếu ở 2 nồng độ 40 và 60 mM. Protein CelB có đuôi dung hợp 6His (biểu hiện bởi pHT1283) thì dung li chủ yếu ở 2 nồng độ 60 và 80 mM. Các kết quả này giúp khẳng định thêm tính liên kết tăng dần của mẫu protein với hạt Ni-NTA khi tăng số lượng Histidine (từ 4-6) trong đuôi dung hợp polyhistidine.



Hình 5. Kết quả hoạt tính CelB thu được của các phân đoạn trong quá trình tinh chế các protein dung hợp bằng Ni-NTA

5. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy: để biểu hiện CelB ngoại bào ở *B. subtilis*, chủng *B. subtilis* 1012 phù hợp hơn chủng WB800N. Đuôi dung hợp 4His có ảnh hưởng tốt (mức A) lên sự biểu hiện CelB khi so sánh với 2 đuôi dung hợp còn lại. Ngược lại, kết quả tinh chế CelB với hạt Ni-NTA cho thấy đuôi 6His cho sự liên kết tốt hơn đuôi 5His, đuôi 4His có sự liên kết kém nhất. Cho nên, có thể kết luận rằng tùy vào đặc điểm của protein mục tiêu ta có thể có lựa chọn khác nhau về đuôi dung hợp: đối với protein khó biểu hiện nên sử dụng đuôi 4His, 5His để có sự biểu hiện tiết cao; còn đối với các protein dễ biểu hiện, nên sử dụng đuôi 6His để có sự liên kết tốt với Ni-NTA, giảm rủi ro bị lẫn với các protein tạp chứa trình tự nhiều Histidine trong tế bào chủng chủ cũng như giảm sự thất thoát khi tinh chế.

Nghiên cứu này cung cấp cách tiếp cận nền tảng cho việc nghiên cứu ảnh hưởng của số lượng Histidine lên sự biểu hiện protein tái tổ hợp. Trong tương lai, nhóm chúng tôi sẽ tiếp tục tiến hành khảo sát ảnh hưởng của số lượng Histidine trong đuôi dung hợp lên sự biểu hiện tiết các Cellulase khác như CelS, CelD... hay sự biểu hiện nội bào với các protein chỉ thị như GFP, BgaB...

- ❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.
- ❖ **Lời cảm ơn:** Cảm ơn Trung tâm Khoa học và Công nghệ sinh học – Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG TPHCM đã tạo điều kiện cho nhóm tác giả hoàn thành đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R.,... & Schäfer, F. (2009). Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods in Enzymology*, 463, 439-473. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63027-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63027-5)
- Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in Enzymology*, 326, 245-254.
- Eveleigh, D. E., Mandels, M., Andreotti, R., & Roche, C. (2009). Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology for Biofuels*, 2, 21. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-21>
- Goel, A., Colcher, D., Koo, J. S., Booth, B. J., Pavlinkova, G., & Batra, S. K. (2000). Relative position of the hexahistidine tag effects binding properties of a tumor-associated single-chain Fv construct. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1523(1), 13-20.
- Mandels, H., Andreotti, M. R., & Roche, C. (1976). Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 16, 21-33.
- Phan, T., Huynh, P., Truong, T., & Nguyen, H. (2017). A Generic Protocol for Intracellular Expression of Recombinant Proteins in *Bacillus subtilis*. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1586, 325-334. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6887-9_21
- Phan, T. P. T. (2007). *Construction and analysis of novel controllable expression vectors for Bacillus subtilis* (Doctoral thesis). Retrieved from <https://epub.uni-bayreuth.de/728/>
- Phan, T. T. P., Nguyen, H. D., & Schumann, W. (2006). Novel plasmid-based expression vectors for intra- and extracellular production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Protein Expression and Purification*, 46(2), 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.07.005>
- Schallmeyer, M., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), 1-17. <https://doi.org/10.1139/w03-076>
- Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(5), 523-533. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1158-6>
- Waugh, D. S. (2005). Making the most of affinity tags. *Trends in Biotechnology*, 23(6), 316-320. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.03.012>

THE IMPACT OF THE AMOUNT OF HISTIDINE IN C-TERMINAL FUSION-TAG ON THE SECRETION OF ENDOGLUCANASE B IN *BACILLUS SUBTILIS*

Le Duong Vuong^{1,2}, *Dang Thi Kim Ngan*¹

*Truong Thong*¹, *Phan Thi Phuong Trang*¹, *Nguyen Duc Hoang*^{1*}

¹University of Science – Vietnam National University in Ho Chi Minh City

²Industrial University of Ho Chi Minh City

*Corresponding author: Nguyen Duc Hoang – Email: ndhoang@hcmus.edu.vn

Received: May 29, 2019; Revised: June 22, 2019; Accepted: July 11, 2019

ABSTRACT

In this research, the host cell Bacillus subtilis and the reporter gene celB were used for evaluating the impact of the amount of histidine in C-terminal fusion tag on the secretion of Endogucanase B. The results show that B. subtilis 1012 is more appropriate for secreting CelB than B. subtilis WB800N. Among three kinds of His tag (4His, 5His, 6His), 6His tag has the most impacts on decreasing the secretion of CelB. In contrast, the surveying of binding capacity of these proteins demonstrates that CelB-6His has the best binding capacity and the fewest leakage (4.78%) while CelB-4His has the most leakage (16.1%) in purifying process by Ni-NTA.

Keywords: *Bacillus subtilis*, Histidine, Endoglucanase B, Pgrac212, fusion tag.