

Biểu hiện gen mã hóa cho β -galactosidase trong tế bào sinh dưỡng của vi khuẩn *Bacillus subtilis*

Nguyễn Quỳnh Uyên*, Trần Thị Trang, Phan Thị Hà, Nguyễn Huỳnh Minh Quyền

Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, ĐHQGHN, 144 Xuân Thủy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 5 năm 2012

Tóm tắt. *Bacillus subtilis* được Hiệp hội Thuốc và Thực phẩm của Mỹ (FDA) đánh giá là vật chủ an toàn. Hơn nữa, dựa trên trình tự bộ gen đã được nghiên cứu đầy đủ, vi sinh vật này được sử dụng như mô hình trong nghiên cứu cơ bản và nghiên cứu ứng dụng. Tuy nhiên, cho đến thời điểm hiện tại (theo những thông tin mà chúng tôi có được) những nghiên cứu biểu hiện gen trong tế bào sinh dưỡng của vi sinh vật này, đặc biệt là biểu hiện không dùng chất cảm ứng, vẫn còn chưa được tiến hành rộng rãi tại Việt Nam. Trong bài báo này chúng tôi đã biểu hiện thành công gen mã hóa cho β -galactosidase như một gen mô hình trong tế bào sinh dưỡng của vi khuẩn *B. subtilis* để phát triển ứng dụng của vi sinh vật an toàn này tại Việt Nam.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, tế bào sinh dưỡng, biểu hiện, β -galactosidase.

1. Mở đầu

Bacillus subtilis, đại diện tiêu biểu của nhóm vi sinh vật Gram dương, là một trong những đối tượng được chú trọng nghiên cứu từ lâu do những ưu điểm nổi bật so với *Escherichia coli*. Khả năng không gây bệnh (*B. subtilis* được Hiệp hội Thuốc và Thực phẩm của Mỹ FDA coi là „generally regarded as safe“ - GRAS) và khả năng chịu đựng các điều kiện nuôi cấy, bảo quản khắc nghiệt hơn [1, 2] của *B. subtilis* là những ưu điểm nổi trội của vi sinh vật này so với *E. coli*. Trong nghiên cứu cơ bản, *B. subtilis* đã được sử dụng như mô hình để nghiên cứu khả năng biệt hoá và cơ chế điều hoà hoạt động của gen trong tế bào [3]. Trong

hướng phát triển các vacxin thế hệ mới, *B. subtilis* đã được phát hiện và nghiên cứu như một công cụ chuyển kháng nguyên an toàn và tiềm năng [4-6]. Mặc dù hệ gen của *B. subtilis* đã được nghiên cứu đầy đủ [7-10], nhưng việc chuyển gen vào *B. subtilis* vẫn là vấn đề nan giải do vector để chuyển gen vào *B. subtilis* vẫn chưa được thương mại hóa và đòi hỏi một số yêu cầu đặc biệt để có thể cài nhập gen đích vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn này.

Theo những thông tin mà chúng tôi có được, ở Việt Nam mới chỉ có rất ít các công trình nghiên cứu về biểu hiện gen trong *B. subtilis* như biểu hiện gen trên vỏ bào tử [11], hoặc biểu hiện gen trong vi khuẩn này bằng cách sử dụng chất cảm ứng IPTG [12] và vẫn chưa có công trình nào nghiên cứu biểu hiện gen trong tế bào sinh dưỡng của vi sinh vật này mà không cần dùng chất cảm ứng. Vì vậy, trong

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-4-37547694.
E-mail: uyennq@vnu.edu.vn

bài báo này chúng tôi biểu hiện gen mã hóa cho β -galactosidase như một gen mô hình trong tế bào sinh dưỡng của *B. subtilis* dưới sự điều khiển của promoter của gen mã hoá cho rRNA (PrnO).

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Các chủng vi sinh vật, môi trường nuôi cấy và cặp môi sử dụng:

Môi trường LB cho nuôi cấy *E. coli* DH5 α , môi trường DSM để nuôi cấy các chủng *B. subtilis* được mua từ hãng Difco (USA).

Các cặp môi được sử dụng (phần gạch chân là vị trí cắt của enzyme giới hạn):

PrnO-F-*Eco*RI:

5'-CCGGAATTCGCATGACCATTATGACTAG-3'

lacZ-R-*Hind*III:

5'-CCGAAGCTTTTTATTTTGGACACCAGACCAACTGG-3'

Các chủng được sử dụng trong bài báo được trình bày trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1. Các chủng vi sinh vật được sử dụng trong bài báo

Tên chủng	Nguồn gốc	Đặc điểm
<i>E. coli</i> DH5 α	Thương phẩm	Biến nạp, nhân dòng và biến đổi di truyền
<i>B. subtilis</i> PY79	Thương phẩm	Dùng trong phòng thí nghiệm, để nhân dòng và biến đổi di truyền
pUL1	Được tạo ra trong nghiên cứu này	<i>E. coli</i> DH5 α chứa vector pUL1 mang đoạn chèn PrnO-RBS của gen <i>sspA-lacZ</i>
pUL2	Được tạo ra trong nghiên cứu này	<i>E. coli</i> DH5 α chứa vector pDG364 mang đoạn chèn PrnO-RBS của gen <i>sspA-lacZ</i>
pUL3	Được tạo ra trong nghiên cứu này	Thế biến nạp của <i>B. subtilis</i> PY79 có đoạn PrnO-RBS của gen <i>sspA-lacZ</i> được cài nhập tại locus <i>amyE</i> trên nhiễm sắc thể
pUL4	Được tạo ra trong nghiên cứu này	Thế biến nạp của <i>B. subtilis</i> PY79 có đoạn PrnO-RBS của gen <i>sspA-lacZ</i> được cài nhập tại locus <i>amyE</i> trên nhiễm sắc thể

2.2. Phương pháp biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* và *B. subtilis*:

Phương pháp chuẩn bị tế bào khả biến của *E. coli* và biến nạp DNA vào vi khuẩn này được thực hiện theo tài liệu tham khảo [13].

Phương pháp tạo tế bào khả biến *B. subtilis* và biến nạp DNA vào tế bào này được thực hiện theo tài liệu tham khảo [14]. Vấn đề là, *B. subtilis* PY79 được nuôi đến pha bão hòa trong môi trường SpC (T base có bổ sung glucose 50%, MgSO₄ 1.2%, bacto yeast extract 10%, casamino acid 1%) và sau đó được nuôi tiếp trong môi trường SpII (thành phần tương tự SpC nhưng có bổ sung CaCl₂ 0.1M). Sau đó

glycerol được bổ sung để đạt đến nồng độ cuối cùng là 10% và được chia vào các ống (200 μ l/ống), giữ ở -80°C đến khi sử dụng. DNA sau khi bổ sung vào tế bào khả biến của *B. subtilis* đã được làm rã đông, được lắc tại 37°C trong 30-45 phút và được trải trên các đĩa chứa môi trường kháng sinh sàng lọc thích hợp.

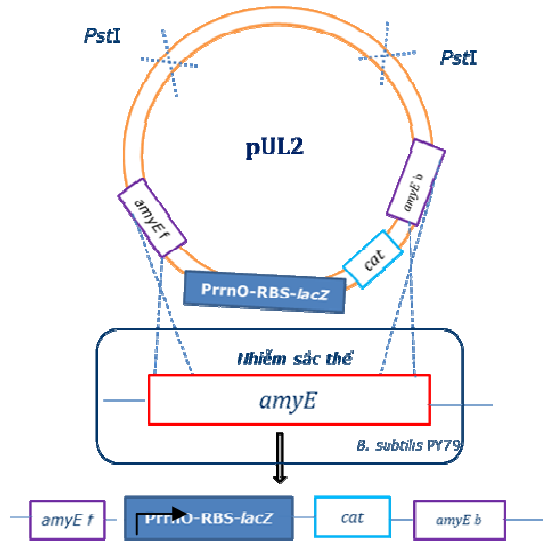
2.3. Phương pháp kiểm tra sự cài nhập và đánh giá hoạt tính gen *lacZ* trong vi khuẩn *B. subtilis*

Vector pDG 364 có chứa gen *lacZ* sẽ được duỗi thẳng bằng cách sử dụng enzyme giới hạn *Pst*I. Gen *lacZ* sẽ được cài nhập theo phương pháp trao đổi chéo kép giữa gen *amyE* của vector pDG364 (chứa hai phần của gen *amyE*,

và gen mã hóa cho chloramphenicol acetyltransferase giữa chúng, xem hình 1) và gen *amyE* trên nhiễm sắc thể của vi khuẩn *B. subtilis* nên thể tái tổ hợp mang gen *lacZ* cài nhập sẽ được kiểm tra theo hai tiêu chí:

- **Kiểm tra khả năng kháng kháng sinh chloramphenicol:** Sàng lọc các thể biến nạp trên môi trường có bổ sung chloramphenicol (50 µg/ml) để lựa chọn thể tái tổ hợp.

- **Kiểm tra hoạt tính amylase:** Do trao đổi chéo kép, gen *amyE* bị mất tính nguyên vẹn dẫn đến mất hoạt tính amylase. Do đó, thể tái tổ hợp không có khả năng phân giải tinh bột. Nhỏ dịch nuôi các thể biến nạp trên đĩa thạch đục lỗ có bổ sung tinh bột (0.1%), ủ 37°C trong 8h, nhuộm đĩa bằng dung dịch lugol, các thể biến nạp không có khả năng phân giải tinh bột (không có vòng sáng trên đĩa) sẽ được lựa chọn.



Hình 1. Cài nhập gen *lacZ* theo phương pháp trao đổi chéo kép vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn *B. subtilis*.

Hoạt độ β -galactosidase được xác định bằng cách cho enzyme này phản ứng với cơ chất tổng hợp o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG). Dưới tác dụng của β -galactosidase, ONPG sẽ thủy phân thành galactose và o-nitrophenol. o-

nitrophenol khi giải phóng sẽ chuyển hỗn hợp phản ứng sang màu vàng và bị hấp thụ ở bước sóng 420nm. Một đơn vị hoạt độ (U) β -galactosidase là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 µmol o-nitrophenol trong 1 phút ở 30°C theo điều kiện thí nghiệm.

$$1 \text{ đơn vị (U)} = \frac{OD_{420} * 1000}{(\text{Thời gian}) * (\text{Thể tích}) * (OD_{600})}$$

Trong đó:

OD₄₂₀: OD của phản ứng màu đo được tại 420 nm

Thời gian: Thời gian phản ứng (phút)

Thể tích: Thể tích dịch nuôi cấy trong phản ứng (ml)

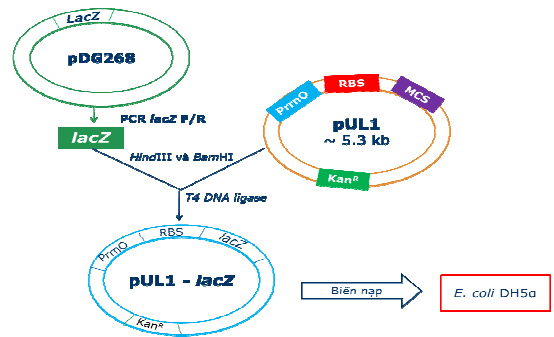
OD₆₀₀: Mật độ tế bào sử dụng trong phản ứng được đo tại 600 nm

2.4. Một số các quy trình thường quy sử dụng trong tách dòng như tinh sạch plasmid, điện di kiểm tra các sản phẩm PCR, cắt kiểm tra đoạn gen chèn thêm trong plasmid...

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tách dòng đoạn DNA bao gồm promoter *PrmO-RBS* của gen *sspA-lacZ* trong vector *pUL1*

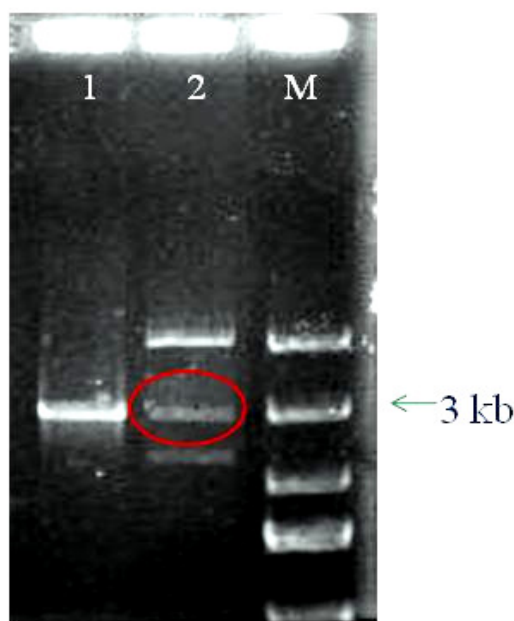
Tách dòng đoạn DNA bao gồm promoter *PrmO-RBS* của gen *sspA-lacZ* được thực hiện theo sơ đồ như hình 2.



Hình 2. Sơ đồ tách dòng đoạn DNA bao gồm promoter *PrmO-RBS* của gen *sspA-lacZ* trong vector *pUL1*.

Vector pUL1 được cung cấp từ Phòng Công nghệ Enzyme-Protein (Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, ĐHQGHN) có chứa promoter *rrnO* (*PrrnO*), RBS của gen *sspA*. Gen *lacZ* được khuếch đại thành công từ khuôn pDG268 có chứa gen này (kết quả không trình bày ở đây). Sản phẩm PCR của gen *lacZ* (được cắt với *Bam*HI và *Hind*III) được chèn vào

vector pUL1 (đã được xử lý với *Bam*HI và *Hind*III) và biến nạp vào tế bào khả biến của *E. coli*. Các thể biến nạp được trải trên môi trường chọn lọc chứa kanamycin (30 µg/ml). Plasmid các khuẩn lạc thu được cắt với enzyme giới hạn *Bam*HI và *Hind*III để kiểm tra đoạn DNA được chèn. Kết quả cắt plamid pUL1 có chứa gen *lacZ* chèn thêm được thể hiện trong hình 3.

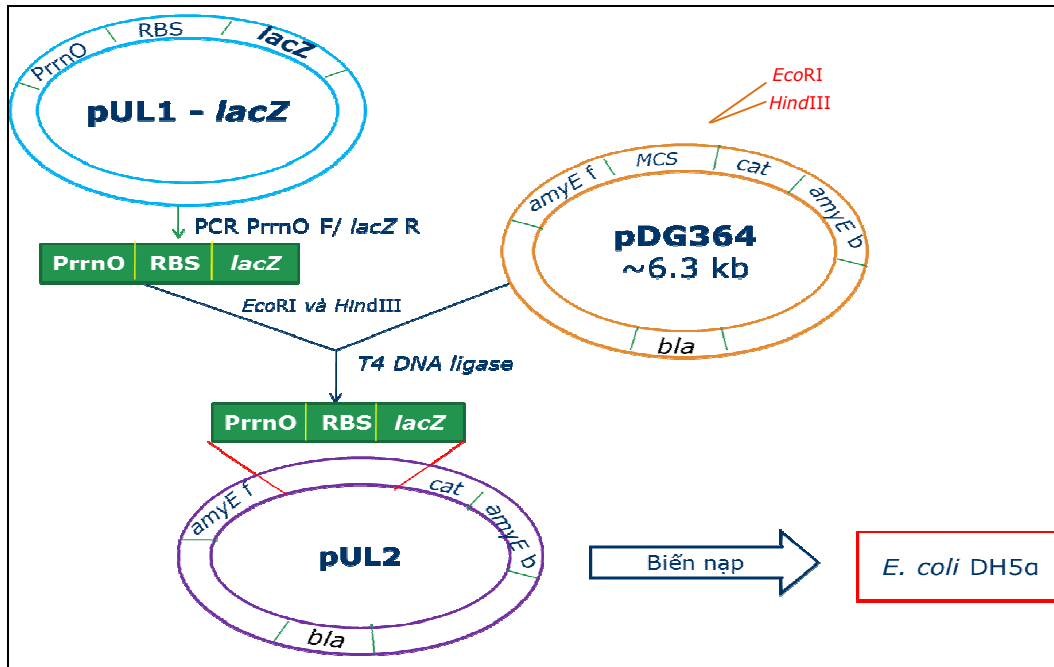


Hình 3. Kết quả cắt plamid pUL1 có chứa gen *lacZ* chèn thêm.
1: sản phẩm PCR có kích thước 3 kb, plamid pUL1 có chứa gen *lacZ* chèn thêm,
M: DNA marker (Express DNA ladder).

Kết quả cho thấy sau khi cắt bởi enzyme giới hạn, plasmid này văng ra một băng có kích thước 3 kb đúng như dự đoán. Điều này chứng tỏ chúng tôi đã nhân dòng thành công gen *lacZ* trong vector pUL1.

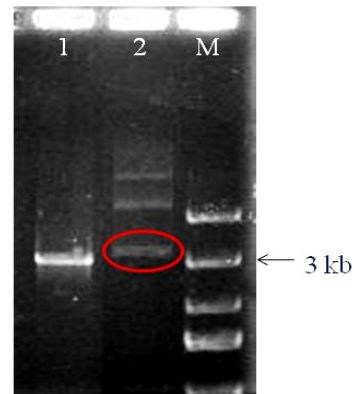
3.2. Tách dòng đoạn ADN bao gồm promoter *PrrnO*-RBS của gen *sspA-lacZ* trong vector pDG364

Tách dòng đoạn DNA bao gồm promoter *PrrnO*-RBS của gen *sspA-lacZ* trong vector pDG364 được thực hiện theo sơ đồ như hình 4.



Hình 4. Sơ đồ tách dòng đoạn ADN bao gồm promoter PrrnO-RBS của gen *sspA-lacZ* trong vector pDG364.

Đoạn DNA bao gồm promoter PrrnO-RBS của gen *sspA-lacZ* được khuếch đại thành công từ pUL1 có chứa gen *lacZ* bằng cách sử dụng cặp mồi như trong phần „Nguyên liệu và Phương pháp“ (kết quả không trình bày ở đây). Sản phẩm PCR của gen *lacZ* (được cắt với *EcoRI* và *HindIII*) được chèn vào vector pDG364 (đã được xử lý với *EcoRI* và *HindIII*) và biến nạp vào tế bào khả biến của *E. coli*. Các thể biến nạp được trải trên môi trường chọn lọc chứa ampicillin (50 µg/ml). Các khuẩn lạc thu được tách plasmid cắt với enzyme giới hạn *EcoRI* và *HindIII* để kiểm tra đoạn DNA được chèn. Kết quả cắt plasmid pUL2 có chứa promoter PrrnO-RBS của gen *sspA-lacZ* chèn thêm được thể hiện trong hình 5.



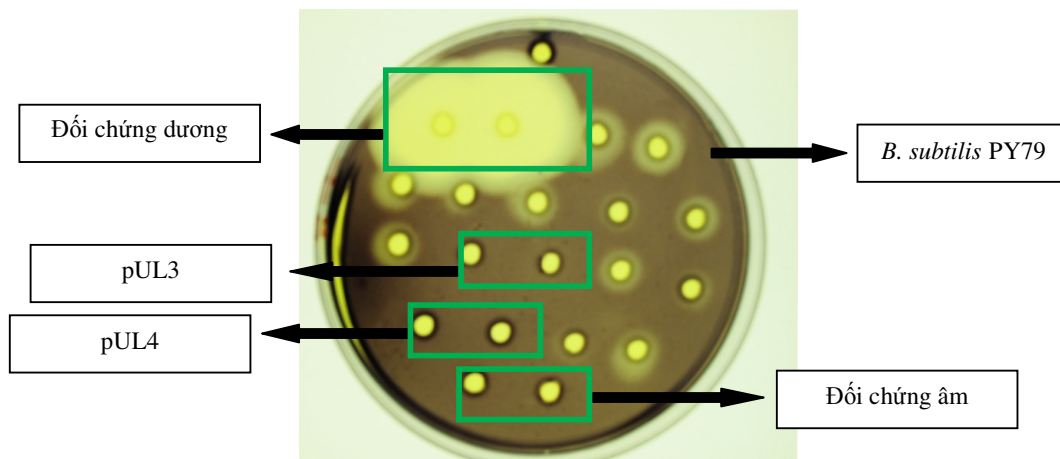
Hình 5. Cắt kiểm tra plasmid pUL2 có chứa đoạn DNA gồm PrrnO-RBS của gen *sspA-lacZ*. 1: sản phẩm PCR có kích thước 3 kb, plasmid pUL2 có chứa đoạn PrrnO-RBS của gen *sspA-lacZ*, M: DNA marker (Express DNA ladder).

Kết quả cho thấy sau khi cắt bởi hai enzyme giới hạn, plasmid pUL2 này văng ra một băng có kích thước hơn 3 kb (PrnO-RBS của gen *sspA-lacZ* có kích thước dự đoán khoảng 3.3 kb). Sau đó plasmid này được tách chiết bằng kit của hãng Roche theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất và được gửi đến hãng Macrogen (Hàn Quốc) để xác định trình tự. Kết quả là, đoạn PrnO-RBS của gen *sspA-lacZ* có trình tự chính xác như các đoạn khuôn mà từ đó PrnO, RBS của gen *sspA* và *lacZ* được khuếch đại và các đoạn nối giữa các đoạn DNA chèn thêm là hoàn toàn đúng khung (kết quả không trình bày ở đây). Điều này chứng tỏ chúng tôi đã nhân

đồng thành công đoạn PrnO-RBS của gen *sspA-lacZ* trong vector pDG364.

3.3. Cài nhập và biểu hiện gen *lacZ* trong vi khuẩn *B. subtilis*

Như trong phần phương pháp, các chủng *B. subtilis* được cài nhập gen *lacZ* theo phương pháp trao đổi chéo kép sẽ mọc trên môi trường chứa chloramphenicol (50 µg/ml) và không có hoạt tính amylase. Vì vậy, sau khi sàng lọc trên môi trường chứa kháng sinh, các thể tái tổ hợp được nuôi cấy trong môi trường lỏng và dịch nuôi cấy này được xác định hoạt tính amylase trên đĩa có chứa cơ chất tinh bột 0.1% (hình 6).



Hình 6. Kết quả xác định hoạt tính amylase của các chủng *B. subtilis* PY79 được biến nạp với vector pUL2.

Dựa trên kết quả hình 6, hai chủng pUL3 và pUL4 đáp ứng đầy đủ cả hai tiêu chí sàng lọc (phát triển trên môi trường chứa chloramphenicol và bị mất hoạt tính amylase) và được chúng tôi lựa chọn. Hai chủng này được nuôi cấy trên môi trường DSM lỏng và dịch nuôi cấy được thu sau 24h để xác định hoạt độ β-galactosidase. Kết quả này được thể hiện trong hình 7.

Chủng	pUL3	pUL4	PY79	Chất nền
So màu hỗn hợp sản phẩm của ONPG bị phân giải bởi enzyme β-galactosidase				
OD600	1.552	1.547	1.581	-
Hoạt độ(U/ml)	5.64	3.94	0.48	-

Hình 7. Xác định hoạt độ β-galactosidase trong các chủng pUL3 và pUL4.

Dựa trên hoạt độ β galactosidase của các chủng pUL3 và pUL4 (khác biệt rõ rệt so với chủng *B. subtilis* PY79), chúng tôi khẳng định đã biểu hiện thành công gen mã hóa cho β galactosidase trong tế bào sinh dưỡng của vi khuẩn *B. subtilis* và hoạt độ của gen này là khá cao.

4. Kết luận

Dựa vào kết quả đã đạt được trên đây, chúng tôi có hai kết luận sau:

- Đã tách dòng thành công gen mã hóa cho β galactosidase dưới sự điều khiển của PrnO và RBS của gen *sspA* của vi khuẩn *B. subtilis* trong vector pDG364

- Đã cài nhập và biểu hiện thành công gen mã hóa cho β galactosidase trong tế bào sinh dưỡng của vi khuẩn *B. subtilis*

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài QG.10.22.

Tài liệu tham khảo

- [1] Driks. A., Bacillus subtilis spore coat, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63 (1999) 1.
- [2] Glick R. Bernard, Pasternak J. Jack, *Molecular Biotechnology: Principle and Application*, Washington, ASM Press, 2003.
- [3] Errington J., Regulation of endospore formation in Bacillus subtilis, *Nature Reviews Microbiology* 1 (2003) 117.
- [4] Duc L.H., and Cutting S.M., Bacterial spores as heat stable vaccine vehicles, *Expert Opin Biol Ther* 3 (2003) 1263.
- [5] Duc L.H., Hong H.A., Fairweather N., Ricca E., and Cutting S.M., Bacterial spores as vaccine vehicles, *Infection and Immunity* 71 (2003) 2810.
- [6] Drabner B., and Guzman C.A, Elicitation of predictable immune responses by using live bacterial vectors, *Biomolecular Engineering* 17 (2001).
- [7] Isticato R., Cangiano G., Tran H.T., Ciabattini A., Medagliani D., Oggioni M.R., De Felice M., Pozzi G., and Ricca E., Surface display of recombinant proteins on Bacillus subtilis spores, *Journal of Bacteriology* 183 (2001) 6294.
- [8] Krásný Libor and Gourse L. Richard, An alternative strategy for bacteria ribosome synthesis: B rRNA transcription regulation, *BMBO Journal* 23 (2004) 4473.
- [9] Mauriello E.M.F., Duc L.H., Isticato R., Cangiano G., Hong H.A., De Felice M., Ricca E., and Cutting S.M. (2004), Display of Heterologous Antigens on the Bacillus subtilis Spore Coat Using CotC as a Fusion Partner, *Vaccine* 22 (2004) 1177.
- [10] Pehines M. Tania, Qazi NA. Saara, Gaddipati R. Sanyasi, Salisbury Vyvyan, Rees ED. Catherine and Hill J. Philip, Construction and evaluation of multisite recombinatorial (Gateway) cloning vector for Gram-positive bacteria, *BMC Molecular Biology* (8:80) (2007) 1471..
- [11] Bùi Thu Thủy, Hoàng Văn Tổng, Phan Hương Trang, Phan Tuấn Nghĩa, Huỳnh Ánh Hồng, Simon Cutting, Nguyễn Thị Vân Anh, Cloning and expression of streptavidin on the outer coat of Bacillus subtilis PY79 spores, *VNU Journal of Science, Natural Science and Technology* 27, No. 2S (2011) 285.
- [12] Nguyễn Thị Thảo, Nguyễn Thị Hiền, Quyền Đình Thi, Biểu hiện gene mã hóa streptokinase từ Streptococcus pyogenes trong Bacillus subtilis, *Hội nghị khoa học kỷ niệm 35 năm Viện KH&CN Việt Nam*, Hà Nội, (2010) 262.
- [13] Sambrook, J., and Russell, D.W., *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd Ed, Cold Spring Harbor laboratory Press, New York, 2001.
- [14] Cutting S.M., and Vander-Horn P.B., Genetic Analysis, In *Molecular Biological Methods for Bacillus*, Harwood, C.R. and Cutting, S.M. (eds). Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd., 1990.

Expression of the gene, encoded for β -galactosidase in the vegetative cells of *Bacillus subtilis*

Nguyen Quynh Uyen, Tran Thi Trang, Phan Thi Ha, Nguyen Huynh Minh Quyen

VNU Institute of Microbiology and Biotechnology, ĐHQGHN, 144 Xuan Thuy, Hanoi, Vietnam

Bacillus subtilis is considered as a GRAS (“generally regarded as safe”) by the FDA (Food and Drug Administration of the US). Moreover, based on completely sequenced genome of this bacterium, *B. subtilis* has been used as a model for basic and application studies. However, to date, (to the best of our knowledge) the gene expression, especially without inducer, in vegetative cells of this bacterium has not been widely performed in Vietnam yet. In this article we successfully expressed the gene encoded for β -galactosidase as a gene model in the vegetative cells of *B. subtilis* in order to develop the application of this safe bacterium in Vietnam.

Keywords: *Bacillus subtilis*, vegetative cells, expression, β -galactosidase.