

P-VL11: PHÁT TRIỂN VECTOR TỰ BIỂU HIỆN CHO *BACILLUS SUBTILIS* DỰA TRÊN PROMOTER PGRAC CẢM ỨNG BẰNG IPTG

Trần Thị Minh Định^{1,3}, Phan Thị Phượng Trang^{1,2}, Trần Linh Thuộc^{1,2}, Wolfgang Schumann^{1,2,4}, Nguyễn Đức Hoàng^{1,2*}

¹ Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

² Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

³ Trường Đại học Sư phạm, Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Bacillus subtilis có nhiều đặc điểm phù hợp để biểu hiện vượt mức protein tái tổ hợp. Nhiều vector biểu hiện đã được phát triển cho vật chủ này. Trong đó, các vector biểu hiện không sử dụng chất cảm ứng phù hợp hơn với nhu cầu sản xuất protein tái tổ hợp ở qui mô công nghiệp vì tiết kiệm chi phí cảm ứng biểu hiện trong sản xuất. Đồng thời, việc kiểm soát biểu hiện trong *E. coli* cũng là tiêu chí quan trọng đối với các vector biểu hiện cho *B. subtilis* vì chúng thường là các vector con thoi. Nhằm tạo ra các vector tự biểu hiện mạnh protein mục tiêu trong *B. subtilis* đồng thời vẫn có thể ức chế biểu hiện nền trong *E. coli*, gen *lacI* trong vector biểu hiện cảm ứng pHT được loại bỏ và tạo ra các vector pHT tự biểu hiện. Kết quả đã tạo ra các plasmid tự biểu hiện mang các promoter Pgrac01, Pgrac57, Pgrac100 và Pgrac212. Ngay cả khi không được cảm ứng bằng IPTG, chúng có thể biểu hiện protein BgaB tương đương với các plasmid cảm ứng biểu hiện mang promoter tương ứng được cảm ứng bằng 1 mM IPTG. Mức độ biểu hiện nền trong *E. coli* bị ức chế từ 2-6 lần, tạo điều kiện cho quá trình tạo dòng. Hơn thế nữa, các vector tự biểu hiện sáp nhập vào bộ gen *B. subtilis* mang các promoter nói trên mang gen *rop* và duy trì số lượng bản sao ở mức trung bình giúp kiểm soát biểu hiện nền trong *E. coli* ở mức thấp. Khi sáp nhập vào bộ gen *B. subtilis*, chúng có thể biểu hiện ổn định protein mục tiêu trong điều kiện không có chất kháng sinh, không có chất cảm ứng. Mức độ biểu hiện BgaB của chủng mang 1 locus sáp nhập có thể lên đến hơn 40% protein nội bào và chủng mang 2 locus sáp nhập có thể biểu hiện BgaB chiếm đến hơn 50% protein nội bào. Như vậy, các vector được tạo ra khá phù hợp với sản xuất protein tái tổ hợp ở quy mô lớn.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, promoter Pgrac, vector pHT tự biểu hiện, vector tự biểu hiện.

DEVELOPMENT OF INDUCER-FREE VECTORS FOR *BACILLUS SUBTILIS* BASED ON IPTG-INDUCIBLE PGRAC PROMOTERS

Trần Thị Minh Định^{1,3}, Phan Thị Phượng Trang^{1,2}, Trần Linh Thuộc^{1,2}, Nguyễn Đức Hoàng^{1,2*}

¹ University of Natural Science, VNU-HCM

² Vietnam National University, Ho Chi Minh City

³ Ho Chi Minh City University of Education

SUMMARY

Bacillus subtilis possesses many dominant characteristics for overexpression of recombinant proteins. Various expression vectors have been developed for this host. Among them, the inducer-free vectors are more suitable for the production of recombinant proteins on an industrial scale because of the savings in production costs. However, repression of background expression in *E. coli* is an important criterion of the expression vectors for *B. subtilis* as they are usually shuttle vectors. In order to create the vectors which can express the target protein at high level in *B. subtilis* while it can repress the background expression in *E. coli*, the *lacI* gene in the pHT IPTG-inducible vectors was removed, result in inducer-free replicative plasmids carrying the Pgrac01, Pgrac57, Pgrac100 and Pgrac212 promoters. Without induction by IPTG, these plasmids can express BgaB at the same level with the cognate IPTG-inducible plasmids when induced by IPTG of 1 mM. The background expression in *E. coli* was repressed 2-6 fold, which facilitates the cloning steps. Furthermore, the inducer-free integrative *B. subtilis* vectors based on the above promoters carry *rop* gene and maintain a moderate number of plasmid copies that help control the background expression in *E. coli* at a low level. When inserted into the *B. subtilis* genome, they are able to exhibit stable expression of the target protein in the absence of an antibiotic or an inducer. The recombinant *B. subtilis* strain with expression cassette incorporated into 1 locus can express BgaB accounting for over 40% of total intracellular proteins. In particular, the recombinant strain carrying expression cassettes merged at 2 loci can express BgaB accounting for more than 50% of total intracellular protein. Thus, the newly constructed vectors are quite suitable for large-scale production of recombinant proteins.

Keywords: *Bacillus subtilis*, inducer-free expression vectors, inducer-free pHTs, Pgrac promoters.

* Author for correspondence: Tel: 0987823246; Email: ndhoang@hcmus.edu.vn