

NGHIÊN CỨU TÁCH DÒNG, BIỂU HIỆN VÀ TINH CHẾ TEV PROTEASE Ở VI KHUẨN *Escherichia coli*

Bùi Thị Thùy Dương, Đỗ Thị Huế, Vũ Thị Hiền, Mai Thùy Linh,
Đông Văn Quyền*

Viện Công nghệ sinh học, Viện HLKHCNVN, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

*Email: dvquyen@gmail.com

Đến Toà soạn: 28/2/2013; Chấp nhận đăng: 18/8/2013

TÓM TẮT

Một trong các thách thức đặt ra đối với công nghệ protein tái tổ hợp đó là khả năng biểu hiện và tinh sạch các protein tái tổ hợp trong tế bào vật chủ, do một số protein không thể biểu hiện hoặc biểu hiện ở dạng không có hoạt tính/chức năng sinh học mong muốn, thậm chí còn gây độc cho vật chủ biểu hiện. Để khắc phục nhược điểm này, protein đích thường được biểu hiện dưới dạng protein lai với một số loại protein dung hợp khác như: Thioredoxin (Trx), Glutathione S transferase (GST), NusA, Maltose binding protein (MBP), Histidin (His)... Tuy nhiên các protein dung hợp lại gây ra nhiều hạn chế khi ứng dụng protein tái tổ hợp vào thực tế như: gây nhiễu hoặc tạo phản ứng dương tính/âm tính giả của kit chẩn đoán, gây dị ứng hoặc các nguy cơ khác của dược phẩm hoặc vaccine,...Do đó protein dung hợp cần phải được xử lý cắt bỏ khỏi protein đích nhờ các protease cắt đặc hiệu. Do tính đặc hiệu cao, TEV protease (TEVp), một protease từ Tobacco Etch Virus (TEV) gây bệnh ở thực vật, hiện được lựa chọn cho mục đích trên. Gen mã hóa TEVp được khuếch đại bằng phản ứng RT-PCR, dòng hóa vào vector biểu hiện pET-21a(+) tạo plasmid tái tổ hợp pETEVp và biến nạp vào tế bào *E.coli* chủng BL21 (DE3) để biểu hiện gen đích. Kết quả nghiên cứu cho thấy, ở điều kiện nhiệt độ 37 °C, 30 °C và 25 °C, TEVp được biểu hiện ở dạng thể vùi nhưng ở 18 °C enzyme này tồn tại chủ yếu ở dạng hòa tan. Điều kiện tối ưu cho biểu hiện của protein tái tổ hợp cũng đã được xác định. TEVp tái tổ hợp (rTEVp) được tinh chế bằng cột sắc ký ái lực Ni-NTA trong điều kiện tự nhiên với độ tinh sạch cao.

Từ khóa: biểu hiện, *E. coli*, Tobacco Etch Virus (TEV), TEV protease.

1. MỞ ĐẦU

TEV protease (TEVp) là một protease đặc hiệu cao được tìm thấy ở Tobacco Etch Virus (TEV). Enzyme này thuộc họ peptidase C4, có khối lượng phân tử khoảng 25–27 kDa [1]. Theo phân loại quốc tế, TEVp được kí hiệu EC.3.4.22.44 [2]. TEVp đóng vai trò quan trọng trong vòng đời của virus TEV và tham gia vào nhiều hoạt động chức năng tế bào như dẫn truyền tín hiệu, sao chép RNA và quyết định độc lực của virus [3, 4]. Vùng xúc tác của enzyme này nằm ở vị trí acid amin từ 189 đến 424 của NIa protease thuần thực [5]. Chúng là sản phẩm của quá trình tự cắt của

N1a protease thuần thực (khối lượng 49 kDa) để tạo ra một protein liên kết với RNA của virus (VPg, 21 kDa) và TEVp [4].

TEVp có khả năng hoạt động trong dải pH rộng từ và chịu được nồng độ muối cao, lực liên kết ion mạnh nên linh động hơn các enzyme khác. Đây chính là ưu điểm vượt trội để TEVp được ưa chuộng hơn những protease khác khi ứng dụng để cắt các protein dung hợp ra khỏi protein đích. Enzyme này có trình tự nhận biết gồm 7 acid amin GluAsnLeuTyrPheGln*Gly/Ser và cắt ở vị trí giữa Gln và Gly/Ser [6]. Về mặt cấu trúc, TEVp giống với các serin protease như chymotrypsin, trypsin và protease 3C của piconavirus [7]. Các protease này đều mang một bộ ba xúc tác gồm histidin, acid aspartic và cystein, tương tự như TEVp. Tuy nhiên điểm khác biệt của TEVp so với các protease khác là tính đặc hiệu cơ chất [8].

Do tính đặc hiệu cơ chất cao và tầm quan trọng của enzym này trong nghiên cứu sinh học... nên TEVp được nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới quan tâm nghiên cứu và biểu hiện. Một trong các hướng tiếp cận chủ yếu là sử dụng công nghệ ADN tái tổ hợp để nâng cao hiệu suất biểu hiện và khả năng tinh sạch của TEVp tái tổ hợp [8, 9,10]. Trong nghiên cứu này chúng tôi trình bày kết quả tách dòng, biểu hiện và tinh sạch TEVp với mục đích tạo được nguồn enzyme này trong nước.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

RNA tổng số của virus TEV được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Sinh học cấu trúc, Trường Đại học Y khoa Sungkyunkwan của Hàn Quốc. Kit tổng hợp cDNA (SuperScript™ Kit), TA cloning Kit từ hãng Invitrogen. Chủng *Escherichia coli* Top 10F', chủng vi khuẩn BL21 (DE3) và vector pET21-a(+) từ hãng Novagen. Kit tinh sạch sản phẩm PCR từ hãng QIAGEN. Gel Extraction Kit (Fermentas), Kit tinh sạch protein (ProBond™ Purification System) từ hãng Invitrogen.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tách dòng và giải trình tự gen TEVp

Gen mã hoá cho TEVp được khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu có gắn thêm vị trí của 2 enzyme *NdeI* và *XhoI* ở đầu 5' tương ứng của mồi xuôi và mồi ngược: mồi xuôi (TEV-FP): 5'-GACATATGGAGAAAGCTTGTTTAAGGG-3'; mồi ngược (TEV-RP): 5'-CTCTCGAGCAC TCATGAGTTGAGTCGCTTC-3'. cDNA được tổng hợp theo bộ Kit SuperScript™ và dùng làm khuôn cho phản ứng PCR để khuếch đại gen *TEVp*. Chu trình nhiệt như sau: Bước 1: 94 °C - 3 phút, bước 2: 94 °C - 1 phút, bước 3: 54 °C - 40 giây, bước 4: 72 °C - 1 phút 20 giây, bước 5: lặp lại 30 chu kỳ từ bước 2 đến bước 4, bước 6: 72 °C - 8 phút. Gen *TEVp* được gắn vào vector pCR® 2.1 tạo pCTEVp, biến nạp vào chủng vi khuẩn *E. coli* TOP 10F' bằng phương pháp sốc nhiệt. Các dòng plasmid tái tổ hợp mang gen *TEVp* được chọn lọc theo phương pháp khuẩn lạc xanh trắng và cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn *EcoRI*. Gen *TEVp* trong vector pCTEVp được xác định trình tự theo phương pháp của Sanger và cộng sự (1997) trên máy ABI PRISM®3100 Genetic Analyzer. Dữ liệu được xử lý bằng phần mềm phần mềm Bioedit và BLAST.

2.2.2. Thiết kế plasmid biểu hiện pETEVp

Gen TEVp được cắt ra khỏi pCTEVp bằng 2 enzyme *NdeI* và *XhoI*, sản phẩm cắt được tinh sạch bằng Gel Extraction Kit thu được gen *TEVp* và gắn vào vector pET21-a(+) đã được cắt mở vòng bằng 2 enzyme tương ứng tạo ra vector biểu hiện pETEVp. Các dòng plasmid tái tổ hợp mang gen *TEVp* được chọn lọc bằng cách cắt kiểm tra với *NdeI* và *XhoI* và giải trình tự để xác định đúng chiều gắn trước khi biểu hiện.

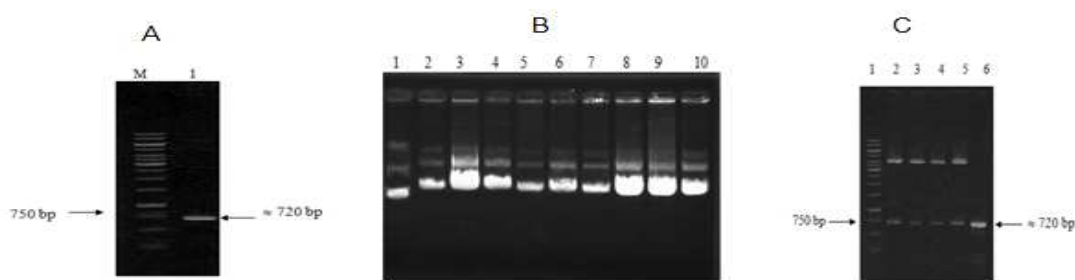
2.2.3. Biểu hiện và tinh sạch TEVp

Để biểu hiện gen mã hóa TEVp, plasmid pETEVp được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* chủng BL21 (DE3). Chủng *E. coli* tái tổ hợp được nuôi lắc ở 37 °C trong 3 giờ (OD₆₀₀ đạt 0,6–1) thì cảm ứng biểu hiện bằng IPTG. Protein tái tổ hợp được thu nhận sau các giờ nuôi cấy và ở các nhiệt độ và nồng độ IPTG khác nhau để tìm điều kiện biểu hiện tối ưu và điện di trên gel 12,5 % polyacrylamide (Laemmli, 1970). TEVp được tinh sạch bằng hệ thống ProBond™ Nickel-Chelating theo hướng dẫn của Invitrogen. TEVp tinh sạch được thẩm tích TEVp qua đêm ở 4 °C trong đệm 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA, 5 mM DTT và bảo quản ở -80 °C trong đệm 50 mM Tris- HCl pH 7,5; 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 50 % Glycerol, 0,1 % Triton X-100.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tách dòng gen TEVp

Gen *TEVp* được khuếch đại bằng phản ứng PCR như đã mô tả ở phần phương pháp. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1 % (hình 1A) cho thấy chỉ 1 băng ADN với kích thước khoảng 720 bp tương ứng với kích thước của *TEVp* được khuếch đại.



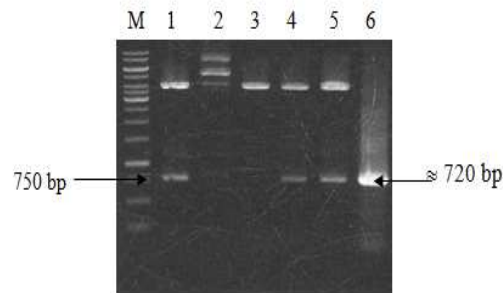
Hình 1. Kết quả nhân dòng gen TEVp.

(A) Kết quả khuếch đại gen *TEVp*, Đường chạy (ĐC) M: Thang ADN chuẩn, ĐC 1: Sản phẩm nhân gen *TEVp*. (B) Kết quả tách chiết plasmid. ĐC 1: Plasmid được tách chiết từ khuẩn lạc xanh; ĐC 2-10: Các plasmid được tách chiết từ 9 khuẩn lạc trắng riêng rẽ. (C) Kết quả cắt pCTEVp bằng *EcoRI*, ĐC 1: Thang ADN 1kb. ĐC: 2-5 sản phẩm cắt bằng *EcoRI*, Đường chạy 6: sản phẩm khuếch đại gen *TEVp*.

Để khẳng định chắc chắn gen được tách dòng là *TEVp* chúng tôi tiến hành giải trình tự với cặp môi M13 (Invitrogen) và bộ Kit Bigdye Terminator v3.1. So sánh trình tự đoạn gen vừa tách dòng với trình tự *TEVp* trên ngân hàng gen bằng chương trình BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Kết quả sự tương đồng là 100 % với trình tự gen *TEVp* trên ngân hàng gen (mã số DQ986288.1), như vậy chúng tôi đã tách dòng thành công gen *TEVp*.

3.2. Kết quả thiết kế vector biểu hiện pETEVp

Vector tái tổ hợp pETEVp được thiết kế như mô tả ở phần phương pháp. pETEVp sau đó được biến nạp vào vi khuẩn *E.coli* TOP 10F⁺. Chọn ngẫu nhiên 4 dòng khuẩn lạc, nuôi cấy trên môi trường LB lỏng có bổ sung Amp, tách chiết plasmid và cắt kiểm tra bằng *Nde*I và *Xho*I. Đây là 2 enzyme đã được chèn vào đầu 5' tương ứng của mỗi xuôi và mỗi ngược. Sản phẩm cắt được điện di trên gel agarose 1% (hình 2). Kết quả cho thấy 3 trong tổng số 4 plasmid kiểm tra có mang gen *TEVp* (tương ứng với các plasmid ở đường chạy 1, 4, 5, hình 2) do xuất hiện một băng ADN có kích thước 720 bp bằng kích thước sản phẩm PCR của gen *TEVp*. Như vậy có thể khẳng định chúng tôi đã thiết kế thành công vector biểu hiện pETEVp mang gen *TEVp*.



Hình 2. Kết quả kiểm tra sản phẩm cắt plasmid pETEVp bằng enzyme cắt giới hạn trên gel agarose 1%.

ĐC M: Thang ADN chuẩn 1Kb; ĐC 1, 3, 4, 5: Sản phẩm cắt của 4 plasmid pETEVp tách từ 4 khuẩn lạc riêng rẽ bằng enzyme giới hạn; ĐC 2: Plasmid gốc; ĐC 6: Sản phẩm PCR gen *TEVp*.

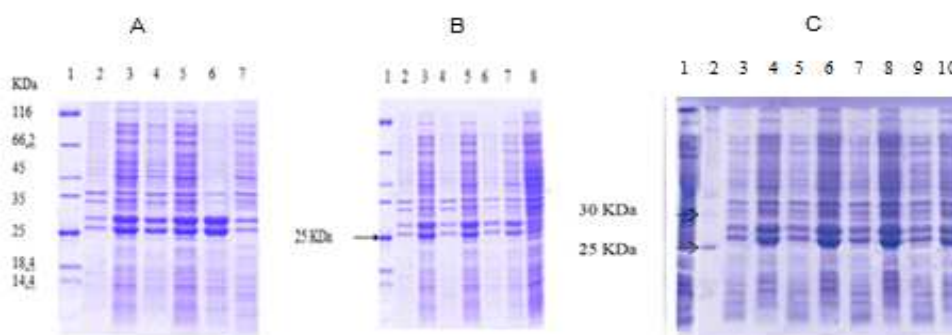
3.3. Kết quả tối ưu hóa các điều kiện biểu hiện TEVp trong vi khuẩn *E. coli*

Mặc dù có tính đặc hiệu cao, tuy nhiên nhiều nghiên cứu in vitro quan sát thấy TEVp nhận biết 1 trình tự cắt không đặc hiệu ở đầu C của chính nó sau vị trí 218 và phân cắt protease này thành 2 phân đoạn nhưng với hiệu suất thấp [11]. TEVp tái tổ hợp khi biểu hiện trong *E. coli* theo lý thuyết có trọng lượng phân tử (MW) 27 kDa, dạng này có hoạt tính mạnh, và sau khi bị cắt bởi chính nó tạo ra phân đoạn TEVp có MW khoảng 25 kDa và dạng này có hoạt tính yếu hơn. Điều này giải thích tại sao khi điện di TEVp trên gel polyacrylamide 12,5% xuất hiện 1 băng protein có MW khoảng 25 kDa và một băng protein có MW khoảng 27 kDa. Trong nghiên cứu này chúng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) được lựa chọn là vật chủ cho biểu hiện gen *TEVp*. Theo công bố của Parks TD và cộng sự 1995 [8], TEVp biểu hiện ở vi khuẩn có thể tồn tại ở cả trạng thái hòa tan và thể vùi. Tùy thuộc vào điều kiện cảm ứng, giai đoạn sinh trưởng của tế bào khi cảm ứng mà lượng protein hòa tan hay thể vùi chiếm ưu thế. Giai đoạn muộn của pha sinh trưởng cho hiệu quả hòa tan cao hơn. Trong dải giá trị OD_{600nm} dịch nuôi cấy trước cảm ứng (từ 0,3 - 0,6) thì ở giá trị OD đạt 0,6 bắt đầu cảm ứng cho hiệu quả hòa tan tốt hơn. Trong nội dung nghiên cứu chúng tôi lựa chọn ra 3 yếu tố: nhiệt độ, thời gian và nồng độ chất cảm ứng IPTG để tối ưu hóa sự biểu hiện của TEVp. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ, nồng độ IPTG và thời gian cảm ứng tới sự biểu hiện của TEVp trong *E. coli* được thể hiện ở hình 3.

E. coli có thể sinh trưởng ở dải nhiệt độ từ 4 – 37 °C. Nhiệt độ ảnh hưởng rất lớn tới trạng thái biểu hiện và số lượng của protein tái tổ hợp. Kết quả của chúng tôi cho thấy, nhiệt độ nuôi cấy thấp tỉ lệ protein hòa tan lớn hơn. Ở các nhiệt độ 18 °C, 30 °C và 37 °C (hình 3A) khi cảm ứng với IPTG đều xuất hiện băng TEVp với kích thước 25 kDa và 27 kDa. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu của tác giả trước [2]. Tuy nhiên ở 18 °C lượng protein hòa tan thu được nhiều hơn so với các nhiệt độ khác và chiếm khoảng 90% protein tổng số. Ở 30 °C tỉ lệ protein tái tổ hợp ở dạng thể vùi và hòa tan tương ứng là khoảng 40% và 60% (hình 3A). Ở 37 °C lượng TEVp lại tồn

tại tới 90 % ở dạng thể vùi. Như vậy nhiệt độ thích hợp biểu hiện TEVp dạng hòa tan là 18 °C. Nhiệt độ này được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo. Do điều kiện không cho phép nên chúng tôi chưa kiểm tra ở các điều kiện nhiệt độ khác như 20, 25 °C.

Thời gian cảm ứng bởi IPTG là yếu tố ảnh hưởng rất lớn tới hàm lượng và trạng thái biểu hiện của protein tái tổ hợp. Do đó chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của yếu tố này đến sự biểu hiện của TEVp. Tế bào được cảm ứng ở điều kiện 18 °C, OD là 0,6 và 1 mM IPTG, sau đó thu mẫu tại các thời điểm 15 giờ, 20 giờ và 24 giờ sau cảm ứng. Dịch tế bào được biến tính và điện di trên gel polyacrylamide 12,5 % (hình 3B). Kết quả điện di cho thấy lượng TEVp tăng dần theo thời gian nuôi cấy, đạt cao nhất ở 24 giờ sau cảm ứng. Chúng tôi cũng khảo sát 1 số thời điểm thu mẫu khác và nhận thấy, sau 3 giờ cảm ứng lượng enzyme biểu hiện rất thấp, sau 8 giờ thu được lượng nhỏ, tuy nhiên sau 28 giờ thì lượng enzyme thu được giảm đáng kể so với thời điểm 24 giờ (hình ảnh không trình bày ở đây). Điều này có thể là do thời gian nuôi cấy lâu sự dẫn đến cạn kiệt nguồn dinh dưỡng và kháng sinh chọn lọc... làm cho vi khuẩn bị rơi vào pha sinh trưởng suy giảm, dẫn đến hiệu quả biểu hiện sẽ giảm. Thời gian tối ưu cho biểu hiện TEVp được xác định là sau 24 giờ sau cảm ứng.



Hình 3. Kết quả tối ưu điều kiện biểu hiện TEVp trong vi khuẩn *E. coli*.

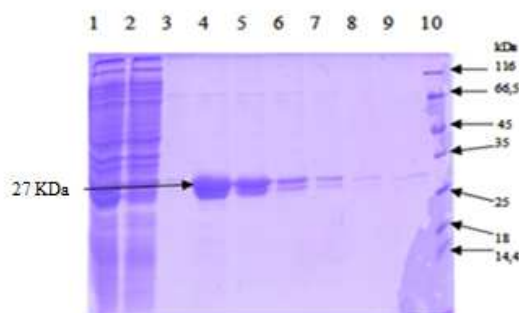
(A) Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ tới khả năng hòa tan của TEVp. ĐC 1: Thang protein chuẩn; ĐC 2, 3: cặn, dịch nổi sau cảm ứng 18 °C; ĐC 4,5: cặn, dịch nổi ở 30 °C; ĐC 6,7: cặn, dịch nổi ở 37 °C. (B) Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian cảm ứng tới sự biểu hiện của TEVp. ĐC 1: thang protein chuẩn; ĐC 2, 3: cặn, dịch nổi sau cảm ứng 24 giờ; ĐC 4,5: cặn, dịch nổi ở 20 giờ; ĐC 6,7: dịch nổi, cặn ở 15 giờ; ĐC 8: mẫu không cảm ứng IPTG. (C) Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ IPTG tới khả năng biểu hiện và tính tan của TEVp. ĐC 1: mẫu không cảm ứng IPTG; ĐC 2: thang protein chuẩn; ĐC 3, 4: cặn, dịch nổi ở 1 mM; ĐC 5,6: cặn, dịch nổi ở 0,7 mM; ĐC 7, 8: cặn, dịch nổi ở 0,4 mM; ĐC 9, 10: cặn, dịch nổi ở 0,1 mM.

Tiếp theo chúng tôi kiểm tra ảnh hưởng của nồng độ IPTG đến hiệu quả và trạng thái biểu hiện của TEVp tái tổ hợp. Kết quả thể hiện trên gel polyacrylamide 12,5 % (hình 3C) cho thấy TEVp khi biểu hiện ở 18 °C sau 24 giờ cảm ứng với IPTG ở các nồng độ 0,1 mM; 0,4 mM; 0,7 mM và 1 mM có mức độ và trạng thái biểu hiện khác nhau. TEVp tồn tại ở dạng hòa tan ở tất cả các nồng độ IPTG khảo sát và đạt cao nhất ở 0,7 mM. Ở 0,1 mM IPTG, TEVp cũng được biểu hiện một lượng tương đối lớn. Ở nồng độ 1 mM IPTG lượng TEVp thu được ở dạng hòa tan là ít nhất. Do vậy chúng tôi lựa chọn nồng độ 0,7 mM để cảm ứng biểu hiện protein này trong các thí nghiệm tiếp theo.

Dựa vào các kết quả khảo sát trên chúng tôi lựa chọn điều kiện biểu hiện tối ưu cho TEVp tái tổ hợp ở 18 °C, nồng độ IPTG là 0,7 mM và thời gian cảm ứng là 24 giờ.

3.4. Kết quả tinh chế TEVp

Protein được tinh chế theo phương pháp tự nhiên (Native Conditions) sử dụng hệ thống tinh sạch Probond Nickel-Chelating Resin (Invitrogen). Quy trình tinh sạch được mô tả trong phần phương pháp nghiên cứu. TEVp tái tổ hợp được đẩy ra khỏi cột bởi dung dịch đệm chứa 300 mM Imidazole. Chúng tôi thu được 7 phân đoạn, mỗi phân đoạn 1 mL, sau đó điện di kiểm tra trên gel polyacrylamide 12,5 % (hình 4). Kết quả cho thấy TEVp thu được cao nhất ở phân đoạn 4 và 5. Hai phân đoạn này được thẩm tích trong đệm (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 5 mM DTT) sau đó định lượng bằng phương pháp Bradford. TEVp tái tổ hợp sau tinh chế có nồng độ là 430 µg/mL.



Hình 4. Kết quả tinh chế TEVp.

ĐC 1: Dịch trước tinh chế; ĐC 2: Dịch chảy qua cột; ĐC 3-9: các phân đoạn khác nhau của dịch đẩy TEVp tái tổ hợp qua cột sắc kí ái lực; ĐC 10: Marker protein.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tách dòng và giải trình tự thành công gen mã hóa TEV protease có nguồn gốc từ Tobacco etch virus. Gen *TEVp* được thiết kế vào hệ thống vector biểu hiện pET-21(a⁺) (Invitrogen) để biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli*. Các kết quả khảo sát cho thấy điều kiện biểu hiện tốt nhất để tạo ra TEVp dạng hòa tan là ở 18 °C, nồng độ IPTG 0,7 mM và thu mẫu sau 24 giờ cảm ứng. TEVp được tinh chế bằng cột ái lực Ni-NTA cho độ tinh sạch cao, nồng độ 430 µg/mL.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sunita M., Valerian V. D., James C. C. - Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: requirements for the translation process and a cis-active element, *Virology* **70** (7) (1996) 4370-4379.
2. <http://proteopedia.org>
3. Dougherty W. G. and Semler B. L. - Expression of virus-encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes, *Microbiol. Rev.* **57** (4) (1993) 781-822.
4. Phan J., Zdanov A., Evdokimov A.G., Tropea J.E., Peters H.K., Kapust R.B., Li M., Wlodawer A., Waugh D.S.- Structural basis for the substrate specificity of tobacco etch virus protease, *J Biol Chem* **277** (52) (2002) 50564-50572.
5. Stols L., Gu M., Dieckman L, Raffin R., Collart F.R., Donnelly M.I.- A new vector for

- high-throughput, ligation – independent cloning encoding a tobacco etch virus protease cleavage site, *Protein Expr. and Purif.* **25** (1) (2002) 8-15.
6. Parks T. D., Leuther K. K., Howard E. D., Johnston S. A., and Dougherty W. G. - Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase, *Anal. Biochem.* **216** (1994) 413-417.
 7. Mathews D. A., Smith W. W., Ferre R. A., Condon B., Budahazi G., Sisson W., Villafranca J. E., Janson C. A., McElry H. E., Gribskov C. L., and Worland S. - Structure of human rhinovirus 3C protease reveals a trypsin like polypeptide fold, RNA – binding site, and means and for cleaving precursor polyprotein, *Cell* **77** (5) (1994) 761-771.
 8. Parks T. D., Howard E. D., Wolpert T. J., Arp D. J., Dougherty W. G. - Expression and purification of a recombinant Tobacco Etch virus NIa proteinase: biochemical Analyses of the Full-length and a naturally occurring truncated protein form, *Virology* **210** (1) (1995) 194-201.
 9. Cabrita L. D., Gilis D., Robertson A. L., Dehouck Y., Rooman M., Bottomley S. P. - Enhancing the stability and solubility of TEV protease using in silico design, *Protein Science* **16** (11) (2007) 2360-2367.
 10. Kapust R. B., Tözsér J., Fox J. D., Anderson D. E., Cherry S., Copeland T. D., Waugh D. S. - Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency, *Protein Eng.* **14** (12) (2001) 993-1000.
 11. Nunn C. M., Jeeves M., Cliff M. J., Urquhart GT, George R. R., Chao L. H., Tsuchia Y., Djordjevic S. - Crystal Structure of Tobacco Etch Virus Protease Shows the Protein C Terminus Bound within the Active Site, *J. Mol. Biol.* **350** (1) (2005) 145-155.

ABSTRACT

CLONING, OVEREXPRESSION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT TOBACCO ETCH VIRUS PROTEASE (TEVp) IN *Escherichia coli*

Bui Thi Thuy Duong, Do Thi Hue, Vu Thi Hien, Mai Thuy Linh, Dong Van Quyen*

Institute of Biotechnology, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi

*Email: dvquyen@gmail.com

One of the challenges for recombinant protein technology is the expression and purification of recombinant proteins in host cells; certain proteins are not expressed or expressed in the inactive forms which do not have their desired biological functions, even toxic to their hosts. To overcome this drawback, the target protein is usually expressed as a fusion protein in which target protein was fused to other protein such as thioredoxin (TRX), Glutathione G-Trans (GST), NusA, Maltose binding protein (MBP), histidine (His), etc. However, the fusion protein would cause a limited application of recombinant protein as it may cause false negative/positive results of diagnostic kits, or allergy when they are used as pharmaceutical or vaccine. Therefore, the fusion protein should be removed from the target protein by treatment with specific protease. Due to the high specificity, TEV protease (TEVp), a protease from Tobacco Etch Virus (TEV), was selected for this purposes. Gene

encoding for TEVp was amplified by RT-PCR, cloned into the expression vector pET21-a(+) to yield recombinant plasmid pETEVp and then transformed into *E. coli* strain BL21 (DE3) to overexpress the target protein. The results indicate that, recombinant TEVp expressed as insoluble form at temperatures of 37, 30 and 25 °C, but at 18 °C it exists mainly in soluble form. Optimal conditions for the expression of recombinant proteins have also been determined. Recombinant TEVp was successfully purified by Ni-NTA affinity chromatography column under native condition with high purity and showed specific activity to its substrate.

Keywords: *E. coli*, Tobacco Etch Virus (TEV), TEV protease.