

QUAN SÁT SỰ BIỂU HIỆN CỦA PROTEIN NGOẠI LAI TRONG TẾ BÀO NẤM MEN NHỜ PROTEIN PHÁT HUỖNH QUANG ECFP

NGUYỄN ĐỨC HOÀNG, TRẦN LINH THUỐC

Trường đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG Tp. HCM

MITSUYOSHI UEDA, ATSUO TANAKA

Đại học Kyoto, Nhật Bản

Để theo dõi và định vị sự biểu hiện của các protein trong tế bào hoặc để phát hiện những thay đổi môi trường hay các tương tác protein, ngày nay người ta thường sử dụng các gen mã hóa cho các protein có khả năng phát huỳnh quang. Hầu hết các gen mã hóa cho các protein phát huỳnh quang được sử dụng rộng rãi hiện nay có nguồn gốc từ GFP (green fluorescent protein) của sứa *Aequorea victoria* như ECFP (enhanced cyan fluorescent protein), EYFP (enhanced yellow fluorescent protein), EGFP (enhanced green fluorescent protein) [4, 5].

Nhiều chiến lược khác nhau đã được sử dụng sao cho sự biểu hiện của gen sẽ tạo ra protein mục tiêu được dung hợp với đầu C hay đầu N của GFP [4]. Sự biểu hiện của gen mục tiêu sẽ được theo dõi bằng kính hiển vi huỳnh quang mà không cần phải cố định tế bào hay phá tế bào, nhờ vậy làm giảm khả năng tạo ra những dương tính giả. Ngoài ra, protein dung hợp GFP không gây độc cho các tế bào chủ [5, 6]. Chính những ưu điểm đó đã làm cho GFP trở thành một reporter được sử dụng rất rộng rãi.

Tại Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học phân tử, Trường đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG Tp. HCM, sử dụng các gen mã hóa protein phát huỳnh quang, chúng tôi đã thiết kế thành công hệ thống gen chỉ thị dùng để nghiên cứu sự biểu hiện của các protein mục tiêu khó có thể định tính hoặc phát hiện trên bề mặt tế bào [3], trong tế bào chất [1] hay trên màng trong của màng tế bào nấm men [2]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành thiết kế các plasmid để quan sát sự biểu hiện của protein A ở các dạng dung hợp với protein phát huỳnh quang ECFP-protein A hoặc protein A-ECFP lên màng trong của màng tế bào nấm men

Saccharomyces cerevisiae.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Các chủng vi sinh vật và điều kiện nuôi cấy

Escherichia coli DH5 α [F⁻, Φ 80lacZ Δ M15, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺), *phoA*, *supE44*, λ , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*] được nuôi cấy ở 37°C trong môi trường Luria-Bertani (LB) [1% trypton (Difco, Mich., USA), 0,5% yeast extract (Difco) và 1% NaCl] có bổ sung 100 μ g/ml ampicillin khi cần, được sử dụng làm tế bào chủ để nhân bản plasmid. *Saccharomyces cerevisiae* MT8-1 (MAT α , *ade*, *his3*, *leu2*, *trp1*, *ura3*) được nuôi cấy ở 30°C trong môi trường YPD [1% yeast extract, 2% polypepton (Difco) và 2% glucoza] hoặc môi trường SD [0,67% yeast nitrogen base (YNB) (Difco), 2% glucoza], được bổ sung các axit amin cần thiết. HEPES được thêm vào môi trường SD đạt 50mM để làm đệm cho môi trường trong thời gian nuôi cấy [9].

2. Plasmid pC-Z-Ste dùng để biểu hiện protein dung hợp ECFP-protein A-Ste được thiết kế như sau

Khuếch đại vùng mã hóa của gen *ECFP* bằng PCR dựa trên khuôn là plasmid pECFP mang gen *ECFP* (Clontech, Calif., USA) với cặp mồi gồm mồi 1F, 5'-TCTGCCGAA-TTCATGGTGAGCAAGGGCGAGG-AGC-3' để tạo vị trí cắt *EcoRI*, và mồi 1R, 5'-GGCCCC-ATGGCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG-AGT-3' để tạo vị trí cắt *NcoI* và loại bỏ stop codon. Đoạn cắt bởi *EcoRI/NcoI* được dòng hóa vào pCAS1 [9] để tạo plasmid pCASCFP.

Khuếch đại vùng mã hóa protein A [7] (một protein trên vỏ của *Staphylococcus aureus*) của gen Z bằng PCR dựa trên khuôn là plasmid pEZZ 18 (Amersham Biosciences, GeneBank M74186) với cặp môi gồm môi 2F, 5'-GCTGCGCAACACGATGAACCATGGGACAACA-3' để tạo vị trí cắt *NcoI*, và môi 2R, 5'-ATCTCATAGAACGCGCTCGAGCCAGAACACCACAGAGAACCTACTTTTCGGCGCCT-3' để thêm trình tự mã hóa GS linker (GSSGGGS) và tạo vị trí cắt *XhoI*. Đoạn cắt bởi *NcoI/XhoI* được dòng hóa vào pCAS1 để tạo plasmid pCASCZA. Khuếch đại đoạn gen *ECFP-Z* dựa trên khuôn là pCASCZA với cặp môi gồm môi 1F ở trên và môi 3R, 5'-CGGTACCTTACATAAGCGTACAACAAACACTATTTGAAGAACCACCACC-3' để gắn thêm đoạn oligonucleotit mã hóa cho 9 axit amin đầu C của Ste18p protein (--SNSV-CCTLM) và tạo vị trí cắt hạn chế *KpnI*. Đoạn cắt *EcoRI/KpnI* được dòng hóa vào plasmid pCAS1 để tạo plasmid pC-Z-Ste. Sản phẩm nối sau đó được biến nạp vào *E. coli* DH5 α . Chọn lọc thể biến nạp bằng PCR khuẩn lạc với cặp môi 1F và môi 3R.

3. Plasmid pZ-C-Ste dùng để biểu hiện protein dung hợp protein A- ECFP-Ste được thiết kế như sau

Khuếch đại vùng mã hóa của gen *ECFP-Ste* bằng PCR dựa trên khuôn là plasmid pECFP-Ste [2] với cặp môi gồm môi 4F, 5'-CGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG-3' để tạo vị trí cắt *NcoI*, và môi 4R, 5'-GCTCGGTACTTACATAA-GCGTACAACAAACTATTTGAAGAACCACCACCAG-3' để gắn thêm đoạn oligonucleotit mã hóa cho 9 axit amin đầu C của Ste18p protein (--SNSVCCTLM) và tạo vị trí cắt *KpnI*. Đoạn cắt *NcoI/KpnI* được dòng hóa vào pCAS1 để tạo plasmid pECFP-Ste. Khuếch đại vùng mã hóa cho protein A của gen Z bằng PCR dựa trên khuôn là plasmid pEZZ 18 (Amersham Biosciences) với cặp môi gồm môi 5F, 5'-GATGAATTCATG-GACAACAAATTC-3' để tạo vị trí cắt *EcoRI*, và môi 5R, 5'-GCCCATGGAACCACCACCAGAAGAACCTACTTTTCGGCGCCTGAGC-3' để thêm trình tự mã hóa GS linker (GSSGGGS) và tạo vị trí cắt *NcoI*. Đoạn cắt bởi *EcoRI/NcoI* được dòng hóa

vào pECFP-Ste để tạo pZ-C-Ste. Sản phẩm nối sau đó được biến nạp vào *E. coli*. Chọn lọc thể biến nạp bằng PCR khuẩn lạc với cặp môi 5F và môi 4R.

4. Giải trình tự

Các đoạn ADN, ECFP-Z-Ste và Z-ECFP-Ste, sau khi được dòng hóa vào vectơ đã được kiểm chứng bằng cách đọc trình tự trên ADN sequencer hiệu 373, Applied Biosystem. Kết quả trình tự này được phân tích so sánh bằng chương trình GENETYX (Software Development Co., Ltd).

5. Các phương pháp khác

Các phản ứng cắt nối ADN, điện di trên gel agarosa và biến nạp vào chủng chủ *E. coli* được thực hiện theo Shambrook và Russel [8]. Biến nạp plasmid vào nấm men theo quy trình của Clontech.

6. Kỹ thuật kính hiển vi huỳnh quang

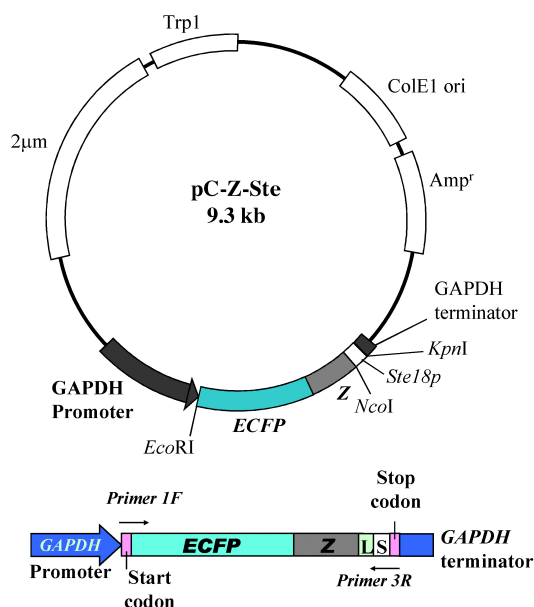
Kính hiển vi huỳnh quang được sử dụng để quan sát trực tiếp hoạt tính ECFP biểu hiện trong tế bào nấm men *S. cerevisiae*. Chủng nấm men MT8-1 được sử dụng làm tế bào chủ để biểu hiện plasmid pC-Z-Ste và pZ-C-Ste. Dòng nấm men MT8-1 mang plasmid pC-Z-Ste (MT8-1/pC-Z-Ste) và pZ-C-Ste (MT8-1/pZ-C-Ste) được nuôi cấy lác 16-24 h ở 30°C trong 10 ml môi trường SD có bổ sung 0,002% histidin, 0,01% loxin, 0,002% uraxil và 0,002% adenin để ức chế sự tạo thành sắc tố không bào đỏ vì sự đột biến của *ade2* [9]. Để quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang, nấm men đã nuôi cấy được ly tâm để thu nhận tế bào. Dịch huyền phù tế bào nấm men được đặt lên phiến kính và lá kính không phát huỳnh quang. Huỳnh quang của ECFP được phát hiện qua các bộ lọc kích thích (440 nm) và phát sáng (480 nm) (Omega optical) của kính hiển vi huỳnh quang Olympus, Nhật Bản.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Thiết kế plasmid pC-Z-Ste dùng cho sự biểu hiện của ECFP-protein A-Ste

Plasmid pC-Z-Ste (hình 1) đã được thiết kế như trong phần phương pháp nghiên cứu. Đây là một plasmid con thoi cho phép tạo dòng, nhân

bản trong *E. coli* với kiểu hình chọn lọc là kháng ampicillin và có thể biểu hiện trong nấm men *Saccharomyces cerevisiae* với kiểu hình chọn lọc là tự dưỡng tryptophan. Chuỗi khởi



Hình 1. Plasmid pC-Z-Ste cho phép mã hóa protein dung hợp ECFP-protein A-Ste

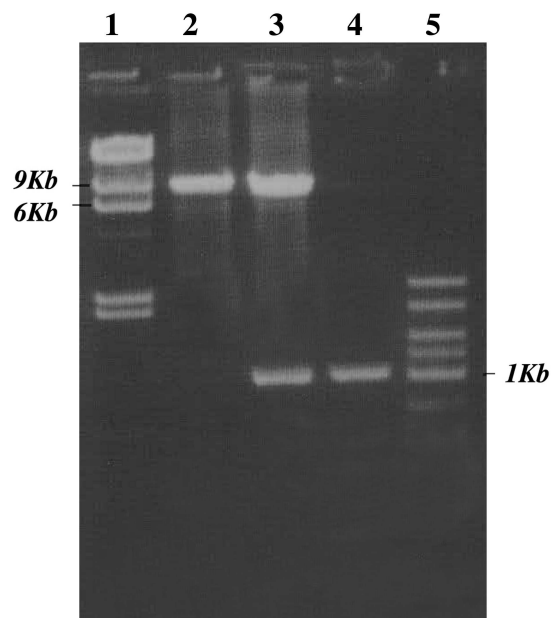
Ghi chú: protein A ở đầu N của ECFP. ECFP, trình tự mã hóa protein phát huỳnh quang ECFP; Z, trình tự mã hóa protein A; L, trình tự mã hóa cho linker GS; Ste18p (Ste), trình tự mã hóa cho 9 axit amin đầu C của protein Ste18p.

nối GS được sử dụng nhằm làm giảm ảnh hưởng qua lại giữa protein dung hợp ECFP-protein A và peptit tín hiệu (9 axit amin đầu C của Ste18p protein) [2]. Plasmid pC-Z-Ste được cắt bằng *EcoRI* và *KpnI* tạo thành 2 đoạn có kích thước như dự đoán và được điện di trên gel agarosa như hình 2, giếng 2. Đoạn gien nhỏ có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR của đoạn gien dòng hóa vào plasmid (hình 1, hình 2, giếng 3) và đoạn DNA lớn có kích thước bằng đoạn lớn của plasmid pCAS1 sau khi được cắt bằng *EcoRI* và *KpnI*.

2. Thiết kế plasmid pZ-C-Ste dùng cho sự biểu hiện protein A-ECFP-Ste

Plasmid pZ-C-Ste (hình 3) đã được thiết kế cũng có cấu trúc tương tự như plasmid pC-Z-Ste. Điểm khác biệt chủ yếu nằm trên đoạn gien tái tổ hợp khảo sát. Protein dung hợp khi được cảm

động GAPDH được sử dụng cho phép biểu hiện ECFP-protein A-Ste thông qua sự cảm ứng bằng glucoza có sẵn trong môi trường nuôi cấy. Đoạn



Hình 2. Bản đồ cắt hạn chế của plasmid pC-Z-Ste

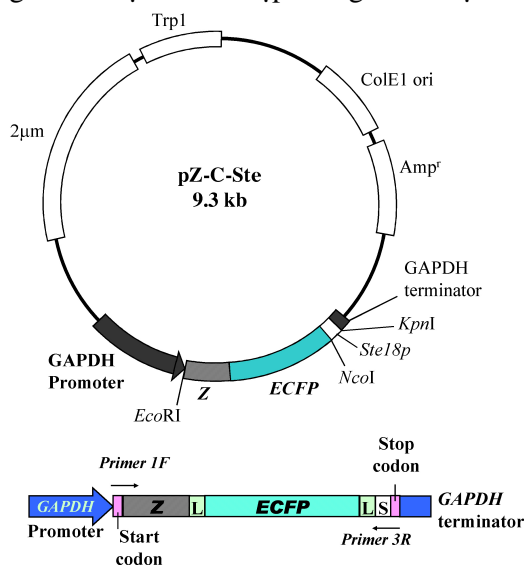
Ghi chú: 1. thang λ -HindIII; 2. đoạn ADN lớn của plasmid pCAS1 sau khi được cắt bằng *EcoRI* và *KpnI*; 3. plasmid pC-Z-Ste được cắt bằng *EcoRI* và *KpnI*; 4. sản phẩm PCR với khuôn là pC-Z-Ste và cặp mỗi mỗi 1F/mỗi 3R; 5. thang ADN 100 bp.

ứng biểu hiện sẽ là protein A-ECFP-Ste. Giữa protein A và ECFP còn có đoạn GS linker nhằm làm giảm ảnh hưởng của protein A lên ECFP, vì sự phát huỳnh quang của ECFP được quyết định chủ yếu bởi phần đầu C. Plasmid pZ-C-Ste được cắt bằng *EcoRI* và *KpnI* và được điện di trên gel agarosa. Kết quả tương tự như trường hợp của pC-Z-Ste (hình 2). Plasmid này cho phép biểu hiện protein dung hợp protein A-ECFP-Ste, trong đó protein A ở đầu C của ECFP.

3. Biểu hiện ECFP-protein A và protein A-ECFP-Ste trên màng tế bào nấm men

Các plasmid sau khi thiết kế được biến nạp vào nấm men *S. cerevisiae* MT8-1, nuôi cấy trên môi trường SD có bổ sung các axit amin cần thiết và quan sát, chụp hình dưới kính hiển vi huỳnh quang. Hình 4 cho thấy dòng nấm men MT8-1/pC-Z-Ste và MT8-1/pZ-C-Ste có khả

năng biểu hiện ECFP tập trung trên mặt trong



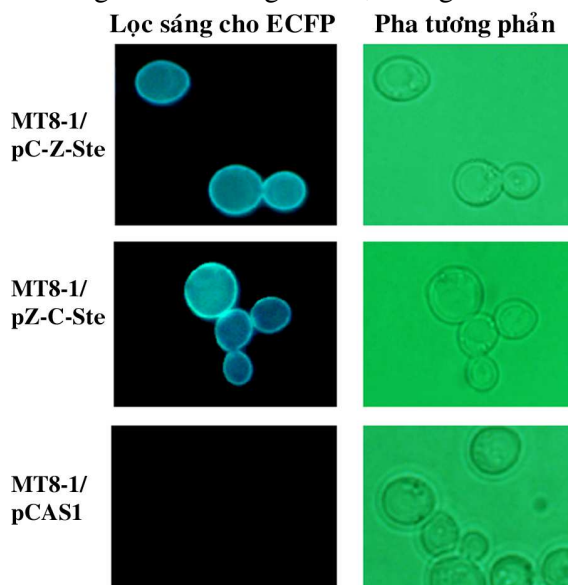
Hình 3. Plasmid pZ-C-Ste cho phép biểu hiện protein dung hợp protein A-ECFP-Ste

Ghi chú: protein A ở đầu C của ECFP. ECFP, trình tự mã hóa protein phát huỳnh quang ECFP; Z, trình tự mã hóa protein A; L, trình tự mã hóa cho linker GS; Ste18p, trình tự mã hóa cho 9 axit amin đầu C của ste18p protein.

MT8-1/pCAS1 đối chứng không biểu hiện ECFP. Kết quả này cho thấy có sự hiện diện của các protein dung hợp ECFP-protein-Ste trong tế bào nấm men MT8-1/pC-Z-Ste và protein A-ECFP-Ste trong tế bào MT8-1/pZ-C-Ste.

Trong các báo cáo trước, chúng tôi đã thiết kế một plasmid cho phép biểu hiện EYFP bên trong tế bào chất [1] và một plasmid khác cho phép biểu hiện ECFP trên mặt trong của màng tế bào sử dụng 9 axit amin đầu C của protein Ste18 làm peptide tín hiệu [2]. Các plasmid đó có thể được sử dụng làm plasmid cơ bản để kiểm tra sự biểu hiện của protein ngoại lai trong tế bào bằng cách quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang. Nhằm kiểm chứng ý tưởng đó, trong báo cáo này, chúng tôi đã thiết kế hai plasmid có mang đoạn gen Z mã hóa cho protein A dung hợp với ECFP. Kết quả ghi nhận được trên hình 4 cho thấy rằng có thể sử dụng protein phát huỳnh quang ECFP để theo dõi sự biểu hiện một protein trên mặt trong của màng tế bào nấm men bằng kính hiển vi huỳnh quang.

của màng tế bào. Trong khi đó, chủng nấm men



Hình 4. Ảnh chụp các dòng nấm men MT8-1/pC-Z-Ste, MT8-1/pZ-C-Ste và MT8-1/pCAS1 đối chứng dương qua kính hiển vi huỳnh quang.

Ghi chú: cột bên trái: lọc sáng cho ECFP, cho phép quan sát ECFP qua kính hiển vi huỳnh quang. Cột bên phải: pha tương phản, cho phép quan sát hình dạng tế bào qua kính hiển vi.

III. KẾT LUẬN

Điểm nổi bật trong nghiên cứu này là có thể quan sát sự biểu hiện của protein A trên mặt trong của màng tế bào chất thông qua protein phát huỳnh quang ECFP. Kết quả đạt được là nhờ việc thiết kế hai plasmid cho phép gắn protein A vào đầu C hoặc N của gen ECFP, biểu hiện các gen này trong nấm men và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang. Sử dụng hệ thống này, bằng cách dòng hóa một gen mục tiêu cần khảo sát khác thay thế cho gen Z (mã hóa protein A) vào đầu C (đối với plasmid pC-Z-Ste) hay đầu N (đối với plasmid pZ-C-Ste) của gen ECFP, chúng ta hoàn toàn có thể quan sát sự biểu hiện của gen mục tiêu đó trên mặt trong của màng tế bào nấm men với kết quả tương tự như trên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Đức Hoàng và cs., 2002: Tạp chí Phát triển khoa học công nghệ, 5: 51-58.

2. **Nguyễn Đức Hoàng và cs.**, 2002: Tạp chí Di truyền học và ứng dụng, 3: 52-58.
3. **Đặng Thị Phương thảo và cs.**, 2003: Báo cáo khoa học Hội nghị toàn quốc lần thứ hai, nghiên cứu cơ bản trong sinh học, nông nghiệp, y học: 1016-1019.
4. **Lo W., Rodgers W., Hughes T.**, 1998: Biotechniques, 25: 94-96.
5. **Martin C., Steven K.**, 1998: Green Fluorescence Protein: properties, applications and protocols. Wiley-Liss, Inc, US.
6. **Michael C. P.**, 1999: Method Enzymol., 302: 3-171.
7. **Nilsson B. et al.**, 1987: Protein Eng., 1(2): 107-113.
8. **Shambrook J., Russel W. D.**, 2001: Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
9. **Shibasaki S. et al.**, 2001: Appl. Microbiol. Biotechnol., 55: 471-475.

OBSERVATION OF THE FOREIGN PROTEIN EXPRESSION IN THE YEAST CELL BY USING THE ENHANCED CYAN FLUORESCENT PROTEIN

NGUYEN DUC HOANG, TRAN LINH THUOC, MITSUYOSHI UEDA, ATSUO TANAKA

SUMMARY

We have successfully constructed two plasmids pC-Z-Ste and pZ-C-Ste, which express a fusion protein containing the ECFP (Enhanced Cyan Fluorescent Protein) and the protein A encoded by the Z gene on the cytoplasmic side of the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* MT8-1. The oligonucleotide encoding the C-terminal 9 amino acids of the Ste18p protein was cloned downstream of the genes encoding the fusion proteins in order to anchor the fusion proteins on the cytoplasmic side of the plasma membrane. A GS linker was used between the fusion protein and the C-terminal of the Ste18p protein for minimizing the interaction among themselves. The Z gene was cloned upstream or downstream of the ECFP gene in order to examine whether the protein A at C terminal or N terminal of CFP affects the expression of the fusion protein. These two plasmids were sequenced to check the inframe between the gene *ECFP*, Z and the C terminal *Ste*. Under the control of the GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) promoter, the expression of the fusion proteins ECFP-Protein A or Protein A-ECFP in the yeast cell could be confirmed by the fluorescent microscope.

Ngày nhận bài: 5-5-2003