



DOI:10.22144/ctujos.2025.001

TẠO DÒNG, BIỂU HIỆN VÀ TÍNH SẠCH OSBHLH061, MỘT NHÂN TỐ ĐIỀU HÒA PHIÊN MÃ CẢM ỨNG KHÔ HẠN Ở LÚA, TRÊN VI KHUẨN *E. coli*

Phạm Thị Minh Thu^{1*}, Yeon-Ki Kim² và Baek Hie Nahm³

¹Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nha Trang, Việt Nam

²Khoa Khoa học Sinh học và Kỹ thuật Môi trường, Đại học Myongji, Hàn Quốc

³GreenGene Biotech Inc., Yongin, Hàn Quốc

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): thuptm@ntu.edu.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 01/07/2024

Sửa bài (Revised): 03/08/2024

Duyệt đăng (Accepted): 21/11/2024

Title: Cloning, expression and purification of the drought-responsive transcription factors OsbHLH061 from rice in *E. coli*

Author(s): Pham Thi Minh Thu^{1*}, Yeon-Ki Kim² and Baek Hie Nahm³

Affiliation(s): ¹Institute of Biotechnology and Environment, Nha Trang University, Viet Nam; ²Department of Bioscience and Environmental Engineering, Myongji University, Korea; ³GreenGene Biotech Inc., Yongin, Korea

TÓM TẮT

OsbHLH061 là một nhân tố điều hòa phiên mã thuộc họ basic helix-loop-helix (bHLH) và được dự đoán hoạt động trong quá trình chống chịu với hạn ở lúa. Nhằm làm rõ vai trò và cơ chế hoạt động của OsbHLH061, việc xác định các trình tự DNA liên kết đặc hiệu với protein này là rất cần thiết, vì từ đó có thể dự đoán được các gen mục tiêu của OsbHLH061. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm tạo dòng, biểu hiện OsbHLH061 trong *E. coli* và tinh sạch protein cho các phản ứng protein-DNA in vitro. Vector biểu hiện được lựa chọn là pET-32a vì sự có mặt của các protein thể làm tăng tính tan (Thioredoxin) và khả năng tinh sạch (Histidine). Kết quả đã tạo dòng thành công pET-HLH061 trong *E. coli*, OsbHLH061 được thiết kế để tạo protein dung hợp với Thioredoxin và Histidine ở đầu N. Protein dung hợp biểu hiện tốt trong pha tan và được tinh sạch thành công bằng phương pháp sắc ký ái lực với Nikel với chất lượng đủ cho các nghiên cứu mục tiêu được đề ra.

Từ khóa: *E. coli*, khô hạn, lúa, nhân tố điều hòa phiên mã, OsbHLH061, tinh sạch

ABSTRACT

OsbHLH061 is a transcriptional factor belonging to the basic helix-loop-helix (bHLH) family and is predicted to function in drought tolerance in rice. To elucidate the role and mechanism of OsbHLH061, it is essential to identify the DNA sequences bound explicitly by this protein, as this can help predict the target genes of OsbHLH061. Therefore, this study aims to clone and express OsbHLH061 in *E. coli* and purify the protein for in vitro protein-DNA interaction assays. The chosen expression vector was pET-32a due to the presence of protein tags that enhance solubility (Thioredoxin) and facilitate purification (Histidine). The results successfully cloned pET-HLH061 in *E. coli*, with OsbHLH061 designed to produce a fusion protein with Thioredoxin and Histidine at the N-terminus. The fusion protein was well expressed in the soluble phase and was successfully purified using Nickel affinity chromatography, yielding sufficient quality for the intended studies.

Keywords: Drought responsive, *E. coli*, OsbHLH061, protein purification, rice, transcription factor

1. GIỚI THIỆU

Họ các nhân tố điều hòa phiên mã (transcription factor, TF) bHLH (basic helix-loop-helix) có vai trò quan trọng trong cả thực vật và động vật. Chỉ riêng trong cây lúa, 167 gen bHLH đã được xác định, và phân tích phát sinh loài dựa trên trình tự gen cho thấy chúng có thể tách thành các nhánh (hay phân họ) một cách rõ ràng (Li et al., 2006). Các nghiên cứu về chức năng các gen này trên lúa cũng đã đạt được các thành quả nhất định và được tóm tắt trong một bài tổng hợp vào năm 2023 của Zuo et al. Xét về chức năng, họ bHLH ở cây lúa được chia thành bốn nhóm liên quan tới các quá trình sinh lý khác nhau ở cây, bao gồm: sinh trưởng và phát triển, tổng hợp trao đổi chất, truyền tín hiệu và phản ứng với stress phi sinh học (Zuo et al., 2023). Liên quan tới quá trình phản ứng của cây với stress phi sinh học có thể kể tới OsICE1, OsICE2, OsbHLH024, 057, 130, 148 (Zuo et al., 2023). Trong một sàng lọc trước đây của chúng tôi dựa trên dữ liệu microarray từ mRNA của lúa thu nhận sau các quá trình stress phi sinh học, OsbHLH061 (tên và số thứ tự của gen được lấy theo quy định trong bài báo của Li et al., 2006; mã số trên cơ sở dữ liệu TIGR tương ứng là LOC_Os11g38870) nằm trong các gen thuộc nhóm có sự tăng biểu hiện khi cây bị mất nước (Pham, 2014). Để làm rõ hơn vai trò của OsbHLH061 và cơ chế hoạt động của nó như một TF, việc khám phá các gen mục tiêu của TF này là một hướng nghiên cứu cần thiết hàng đầu.

Mặc dù TF có thể kiểm soát quá trình phiên mã của gen mục tiêu thông qua các cơ chế khác nhau (Bervoets & Charlier, 2019), nhưng các cơ chế này về cơ bản dựa vào sự tương tác của chúng với TFBS (vị trí liên kết nhân tố phiên mã, transcription factor binding sites, hay còn gọi là yếu tố *cis*, *cis*-acting element) (He et al., 2023). TFBS là các trình tự DNA đặc hiệu nằm ở promoter của gen mục tiêu mà các TF có thể nhận biết và gắn chọn lọc, từ đó điều hòa sự biểu hiện của gen (Nguyen et al., 2017; He et al., 2023). Xác định được các trình tự TFBS sẽ giúp cho việc dự đoán các gen mục tiêu của TF trở nên dễ dàng hơn và phần nào giải thích được chức năng của các nhân tố này, đặc biệt khi đã biết vai trò của các gen mục tiêu.

Liên kết giữa TFBS và TF có thể được thực hiện bằng các kỹ thuật truyền thống như xét nghiệm điện di di động (electrophoretic mobility shift assays, EMSA), xét nghiệm liên kết màng lọc nitrocellulose (nitrocellulose filter-binding assays), xét nghiệm dấu chân (footprinting assays) và lai đơn nầm men (Hellman & Fried 2007; Helwa & Hoheisel 2010).

Mặc dù hiệu quả nhưng các kỹ thuật này còn chậm, tốn công sức và đòi hỏi phải có những thông tin nhất định về TFBS và TF.

Hiện nay, các kỹ thuật dung lượng cao đã ra đời nhằm sàng lọc hàng loạt các trình tự có khả năng liên kết với protein chỉ trong một phản ứng, trong đó phải kể tới kỹ thuật microarray liên kết protein (protein binding microarrays, PBM). Riêng PBM cho đối tượng cây lúa thì nhóm nghiên cứu của Phòng thí nghiệm sinh học phân tử, Đại học Myongji (Hàn Quốc) đã phát triển từ 2009 (Kim et al., 2009) và cải tiến dần trong hơn 10 năm để chứng minh tính hiệu quả của PBM này cho mục tiêu xác định TFBS của các TF (Kim et al., 2012; 2017; 2021). Để phục vụ cho thí nghiệm này thì cần cung cấp một lượng đủ lớn protein và protein được sản xuất bằng kỹ thuật tạo dòng là một câu trả lời phù hợp.

Do đó, trong nghiên cứu này, dòng được tạo, biểu hiện OsbHLH061 trong *E. coli* và tinh sạch protein với mục tiêu dùng làm nguyên liệu cho PBM. Các trình tự có tính liên kết cao với protein trong PBM có thể là các TFBS của TF, từ đó suy ra các gen mục tiêu để hỗ trợ giải thích cho vai trò của OsbHLH061 trong sinh lý cây lúa. Ngoài ra, protein này cũng có thể dùng trong các thí nghiệm khẳng định kết quả tiếp theo như EMSA, lai đơn nầm men hay làm kháng thể đa dòng trong phân tích cây chuyển gen OsbHLH061.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chủng chủ và plasmid

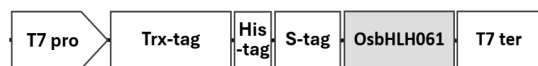
Chủng *E. coli* DH5 α (Stratagene, Mỹ) được sử dụng cho bước tạo dòng, chủng *E. coli* BL21(DE3) (Stratagene, Mỹ) sử dụng cho biểu hiện protein tái tổ hợp. Vùng trình tự mã hóa OsbHLH061 dài 837 bp được nhận từ thư viện cDNA của công ty GreenGene Biotech, GGB (Yongin, Hàn Quốc). Plasmid pET-32a (Novagen, Đức) được sử dụng làm vector tạo dòng, đồng thời là vector biểu hiện protein tái tổ hợp nhờ vào promoter T7 có trên plasmid giúp kiểm soát sự biểu hiện gen thông qua chất cảm ứng IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside).

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tạo vector tái tổ hợp pET-HLH061 và chuyển gen vào *E. coli*

Vùng trình tự mã hóa OsbHLH061 được thu nhận bằng cách khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu. Mỗi xuôi có bổ sung trình tự nhận diện của enzyme EcoRI (F-RI: cccGAATTCatgccccaagt) và mồi

ngược bổ sung trình tự của XhoI (R-Xh: cccCTCGAGctagccctttt). Mỗi ngược chứa stop codon để tạo protein dung hợp đầu N với các thẻ protein (Hình 1) trong pET-32a (Novagen, Đức). Sản phẩm PCR sau tinh sạch bằng QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Đức) và vector pET-32a được xử lý bằng hỗn hợp enzyme EcoRI và XhoI (Takara, Nhật Bản) để tạo đầu so le cho bước nối bằng enzyme T4 ligase (Takara, Nhật Bản). Vector tái tổ hợp pET-HLH061 được chuyển vào vi khuẩn *E. coli* DH5α và BL21(DE3) (Stratagene, Mỹ) bằng cách sốc nhiệt theo hướng dẫn của nhà sản xuất.



pET-HLH061

Hình 1. Sơ đồ cấu trúc của vector tái tổ hợp pET-HLH061

2.2.2. Sàng lọc chủng chuyển gen

Các vi khuẩn sau khi chuyển gen được trải trên môi trường thạch LBA (môi trường Luria Bertani có chứa ampicilin nồng độ 50 µg/mL và 12g/L agar). Sau khi ủ ở 37°C qua đêm, các khuẩn lạc *E. coli* DH5α được sàng lọc bằng cách PCR với cặp mồi đặc hiệu (F-RI dùng để tạo dòng ở trên và T7-ter từ công ty GGB, Hàn Quốc với trình tự ctagcataacccttggggcctctaaacgggtcttgggggtttttg) để khẳng định sự có mặt của gen chuyển, đoạn DNA thu được có kích thước dự đoán là 980 bp. Với khuẩn lạc của *E. coli* BL21(DE3) thì sử dụng cặp mồi T7 (taatacgactcactat) và T7-ter (đều được cung cấp bởi công ty GGB, Hàn Quốc) để khuếch đại đoạn DNA dài 1563 bp. Sau đó, vi khuẩn được nuôi cấy tăng sinh qua đêm tại 37°C trong môi trường LB lỏng chứa 50 µg/mL ampicilin. Plasmid được thu nhận bằng bộ kit tách plasmid (Qiagen, Đức) và chuyển sang giải trình tự tại công ty GGB (Hàn Quốc) với 2 mồi T7 và T7-ter bắt cặp đặc hiệu tương ứng với T7 promoter và T7 terminator. Chủng vi khuẩn khẳng định qua giải trình tự được dùng để biểu hiện protein.

2.2.3. Kiểm tra sự biểu hiện protein

Kích thước của protein mục tiêu được dự đoán bằng phần mềm cung cấp bởi BCCM/GeneCorner (Bi) tại https://www.genecorner.ugent.be/protein_mw.html

Thí nghiệm kiểm tra khả năng biểu hiện và tính tan của protein được thực hiện trong thể tích nhỏ (tổng 11 mL). Trước hết, vi khuẩn được nuôi qua đêm tại 37°C trong 3 mL LB lỏng có bổ sung 50 µg/mL ampicilin để tạo dịch vi khuẩn gốc. Sau đó, 1 mL dịch vi khuẩn gốc này được chuyển sang 10

mL môi trường LBA lỏng mới, nuôi trong 37°C cho tới khi OD600 đạt 0,6 thì được bổ sung IPTG để đạt nồng độ cuối cùng là 1 mM. Vi khuẩn tiếp tục được nuôi tại 22°C trong 4h để tạo điều kiện cho sự biểu hiện protein. Kết thúc quá trình, tế bào được thu bằng ly tâm trong 5 phút, tốc độ 5000 rpm, tại 4°C. Phần lắng sau đó được hòa tan lại với 2 mL phosphate-buffered saline (PBS) có chứa chất ức chế protease, sau đó được ly giải bằng sóng siêu âm trong 5 phút với khoảng bắn sóng và nghỉ là 30s/30s. Trong quá trình thực hiện, các dịch luôn được giữ trong khay đá. Sau khi ly tâm ở 4°C trong 30 phút với tốc độ 13,000 rpm phần dịch nổi được tách riêng, phần cặn tiếp tục được hòa tan bằng 200 µL dung dịch PBS. Các phần này đại diện cho protein tổng của pha tan (dịch nổi) và không tan (phần tủa/lắng hòa tan lại trong PBS). Mỗi pha được lấy 20 µL để trộn với 10 µL thuốc nhuộm 4x (chứa Bromophenol blue là chất hiện màu) và 10 µL nước cất tạo thành hỗn hợp nạp mẫu trên SDS-PAGE.

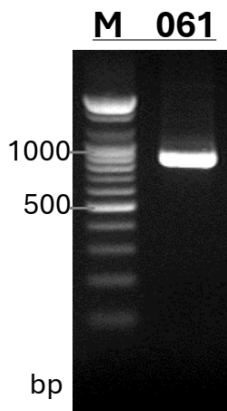
2.2.4. Tinh sạch protein

Sau khi xác định được sự biểu hiện và tính tan của protein, vi khuẩn được nuôi với thể tích lớn hơn (tổng là 55 mL) nhằm thu được nhiều protein, phục vụ cho bước tinh sạch. Vi khuẩn gốc được nuôi trong 5 mL LBA lỏng qua đêm và bổ sung vào môi trường LBA lỏng mới theo tỉ lệ 1:10, tiếp tục nuôi ở 37°C cho tới khi OD600 đạt 0,6 thì được bổ sung IPTG để đạt nồng độ cuối là 1 mM, nuôi tại 22°C trong 4h. Tế bào sau đó được thu bằng ly tâm trong 5 phút, tốc độ 5000 rpm, 4°C. Cặn tế bào sau đó được giữ trong tủ -20°C qua đêm để sử dụng cho bước tinh sạch protein. Protein dung hợp với thẻ Histidine được tinh sạch bằng sắc ký ái lực với Nikel, sử dụng resin Ni-NTA của Qiagen (Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Protein tinh sạch được thu trong 3 lần rửa giải (chứa imidazol ở nồng độ 250 mM), mỗi lần có thể tích 500 µL, rửa giải lần đầu được ủ trong 30 phút, các lần sau ủ 10 phút. Nồng độ protein được xác định bằng phương pháp Bradford (Biorad), dựa trên đường chuẩn được xây dựng cho BSA (Albumin huyết thanh bò, Merck).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo dòng pET-HLH061

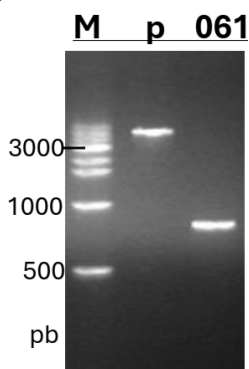
Sản phẩm PCR với cặp mồi F-RI và R-Xh được điện di trên gel agarose 1,5% cho thấy 1 vạch sáng rõ, nằm trong khoảng từ 800-900 bp (Hình 2), phù hợp với kích thước dự đoán ban đầu của OsbHLH061 là 837 bp.



Hình 2. Sản phẩm PCR của gen mã hóa protein OsbHLH061.

M: thang DNA 100bp của Bioneer (Hàn Quốc); 061: OsbHLH061

Sản phẩm này sau đó được tinh sạch và cắt bằng hỗn hợp enzyme EcoRI và XhoI. Plasmid pET-32a cũng được xử lý bằng 2 enzyme tương tự. Các hỗn hợp phản ứng sau đó được tinh sạch và chạy trên gel (Hình 3). Giếng vector cho thấy 1 băng sáng, rõ và gọn gàng ở vị trí hơn 5000 bp chứng tỏ vector đã được mở vòng hoàn toàn.

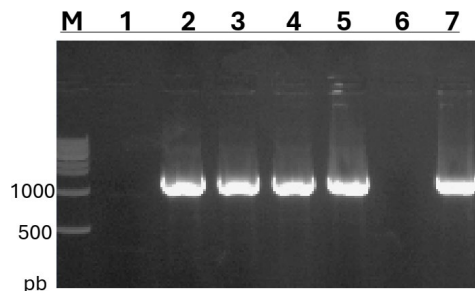


Hình 3. Vector pET-32a (giếng p) và OsbHLH061 (giếng 061) sau khi cắt bằng 2 enzyme EcoRI và XhoI

M: thang DNA 1kb của Bioneer (Hàn Quốc).

Các khuẩn lạc phát triển trên môi trường có chứa ampicilin chứng tỏ đã được chuyển với pET-32a. Nhằm khẳng định OsbHLH061 đã được tái tổ hợp thành công vào pET-32 đúng chiều, các khuẩn lạc đã được khuếch đại với mỗi xuôi nằm trên HLH061 (F-RV) và mỗi ngược nằm trên vector (T7-ter). Đoạn trình tự thu được có kích thước dự đoán là 980 bp. Hình ảnh bản gel điện di cho thấy 5/7 chủng được khuếch đại đều cho ra 1 băng DNA tương ứng với vạch 1kb của thang chuẩn. Do đó, chủng 2 và 4

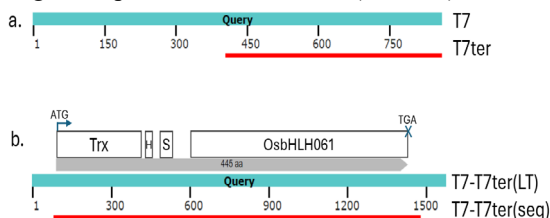
được chọn để nuôi cấy tăng sinh, tách plasmid và giải trình tự.



Hình 4. Kết quả PCR khuẩn lạc với 2 primer F-RI và T7ter của vi khuẩn E. coli DH5α chuyển gen

M: thang DNA 1kb của Bioneer (Hàn Quốc). 1-7: các chủng vi khuẩn dự tuyển

Kết quả giải trình tự pET-HLH4 của chủng số 4 với 2 môi T7 và T7-ter đều cho các vùng đọc rõ khoảng 800-1000 nucleotide, trong đó 2 đoạn trùng khớp với nhau một vùng 457 nucleotide (thanh chữ nhật màu đỏ, Hình 5a) nằm ở cuối trình tự thu nhận được từ mỗi môi. Từ đó, khi ghép nối 2 trình tự đã giải mã lại thu được đoạn trình tự kí hiệu T7-T7ter (seq), phân biệt với T7-T7ter(LT) là vùng trình tự từ T7 promoter tới T7 terminator dự đoán theo lý thuyết. T7-T7ter(seq) trùng khớp 100% và nằm hoàn toàn bên trong trình tự dự đoán T7-T7ter(LT). Vùng trùng khớp bao phủ trình tự toàn bộ khung đọc mở để tạo protein dung hợp từ start codon của Trx-Tag và stop codon của HLH061 (Hình 5b).



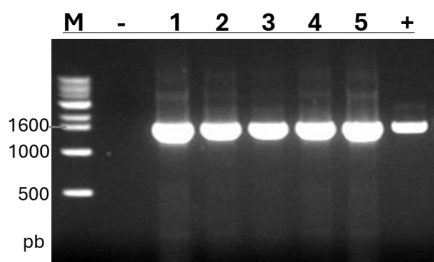
Hình 5. Kết quả đóng hàng các trình tự DNA

(a). Vùng trùng lặp của kết quả khi giải trình tự bởi 2 primer T7 và T7-ter, tương ứng trình tự từ khoảng 400 đến 780 bp của trình tự giải bởi primer T7. Vùng không trùng lặp của trình tự giải bởi T7ter không được biểu diễn trong hình. (b). Vùng trùng lặp của trình tự T7-T7ter sau giải trình tự và T7-T7ter lý thuyết bao trùm toàn bộ khung đọc mở để tạo protein dài 445 acid amin. Đây chính là protein dung hợp bao gồm 3 protein thể ở đầu N (Trx: thioredoxin, H: histidine, S: S-peptide) và OsbHLH061 ở đầu C.

E. coli DH5α là một trong các chủng E. coli được sử dụng nhiều nhất trong các phòng thí nghiệm với mục đích tạo dòng các gen có kích thước nhỏ

(Kostylev et al., 2015). Chúng đã được thiết kế chuyên biệt cho mục đích tạo dòng nên các plasmid chuyển vào có sự ổn định hơn trong quá trình chuyển gen, nhân lên cũng như quá trình tách chiết. Tuy nhiên, DH5 α không biểu hiện được gen dưới sự điều khiển của T7 promoter vì thiếu T7 polymerase. Do đó, gen sau khi tạo dòng trong chủng DH5 α sẽ được chuyển vào một chủng khác cho biểu hiện gen, ví dụ như *E. coli* BL21(DE3). BL21 (DE3) ngược lại được điều chỉnh làm mất một số protease, do đó tăng tích lũy protein ngoại lai và giảm sự phân cắt protein trong quá trình tinh sạch (Samuelson, 2011) nhưng không giải quyết được các vấn đề về plasmid chuyển gen như trong *E. coli* DH5 α , vì vậy lại không thích hợp cho việc tạo dòng ngay từ đầu. Việc sử dụng 2 chủng *E. coli* khác nhau cho tạo dòng và biểu hiện gen đã được nhiều nhóm nghiên cứu sử dụng cả trong và ngoài nước (Do et al., 2017; Yuan et al., 2020; Tu et al., 2022).

Trong nghiên cứu này, plasmid pET-HLH061 của chủng *E. coli* DH5 α số 4 sau khi được khẳng định bằng giải trình tự được lưu trữ và sử dụng cho chuyển gen vào *E. coli* BL21(DE3). Các khuẩn lạc *E. coli* BL21(DE3) sau chuyển gen khi khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu T7, T7ter đều cho một băng DNA ở vị trí khoảng 1,6 kb khớp với kích thước dự kiến là 1563 bp và trùng với băng của đối chứng dương là plasmid tách từ chủng *E. coli* DH5 α số 4. Chủng *E. coli* BL21 số 1 sau đó cũng được giải trình tự với cặp mồi T7 và T7ter (GGB, Hàn Quốc) để đảm bảo không có sai lệch gì về trình tự DNA nằm ở vùng tương ứng với protein dung hợp.



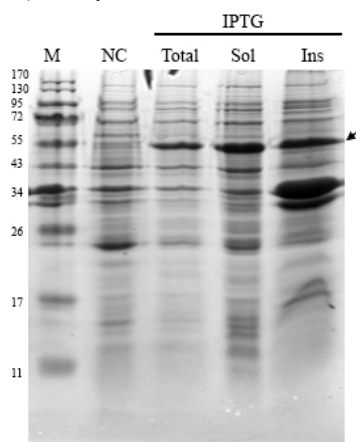
Hình 6. Kết quả PCR khuẩn lạc với cặp mồi T7-T7ter của vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) sau chuyển gen

M: thang DNA 1kb của Bioneer (Hàn Quốc), -: đối chứng âm (không có DNA mẫu), +: đối chứng dương (plasmid pET-HLH061), các giếng 1-5: các chủng vi khuẩn dự tuyển.

Biểu hiện protein

Protein dung hợp được biểu hiện trong *E. coli* BL21(DE3) dưới sự kích thích của IPTG. Kết quả trên SDS-PAGE cho thấy giữa tế bào không được

kích thích và tế bào kích thích biểu hiện khác nhau ở một vài băng, đặc biệt có một băng rất đậm ở kích thước khoảng gần 55 kDa (mũi tên trong Hình 7). Theo dự đoán thì protein dung hợp Trx-His-S-HLH061 có khối lượng khoảng 48kDa. Như vậy, có thể đây là băng của protein mục tiêu. Vạch này đậm hơn trong pha tan so với không tan (Hình 7) cho thấy protein dung hợp có tính tan tốt. Điều này có thể do bản chất tan của protein HLH061 nhưng cũng có thể do tác dụng của thể protein Trx vì đây là một protein đã được báo cáo là có tính tan cao và khi dung hợp với một protein khác thì có thể làm tăng tính tan của protein được dung hợp (Young et al., 2012). Tuy nhiên, Trx không có ái lực nội tại nên cần sử dụng một protein thể khác cho mục đích tinh sạch (Sofia et al., 2014), ở đây là thể 6x Histidine.



Hình 7. Kết quả chạy điện di SDS-PAGE của các hỗn hợp protein

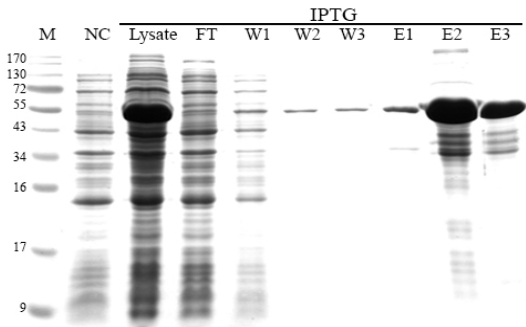
M: thang chuẩn protein, NC (non-induced control, đối chứng âm): tế bào không được kích thích biểu hiện gen bằng IPTG, total: protein tổng của tế bào được kích thích bởi IPTG, Sol: protein pha tan, Ins: protein pha không tan.

Tinh sạch protein

Protein tổng trong pha tan được dùng để tinh sạch protein dựa trên sắc ký ái lực của Histidine với Nikel.

Trong các giếng tương ứng với mẫu từ tế bào được kích thích biểu hiện bởi IPTG, giếng Lysate có một vạch đậm rõ ràng tương ứng với protein mục tiêu, FT không còn nữa chứng tỏ protein tại băng đó đã được giữ lại hiệu quả trong cột resin. W1 hiện diện đầy đủ các vạch tương ứng nhưng mờ hơn FT chứng tỏ có sự giữ lại các protein không đặc hiệu trong cột, các protein này được rửa trôi trong W1. Đến W2 và W3 thì chỉ còn 1 vạch tương ứng với protein mục tiêu, như vậy các băng phụ đã được rửa

trời tối đa. Trong 3 lần rửa giải thì E1 cho kết quả dung dịch protein có nồng độ nhỏ nhất, E2 lớn nhất và E3 đã giảm nhưng vẫn cao hơn E1. Điều này có thể giải thích được vì trong lần rửa giải đầu tiên, chất cạnh tranh (imidazol) chưa tiếp xúc hết với các vị trí nên việc đẩy các protein ra còn hạn chế. E2 là lần rửa giải tốt nhất, hiệu quả giảm dần qua các lần tiếp theo (Hình 8). Kết quả đo nồng độ (Bảng 1) cho thấy lượng protein trong E2 (2,61 µg/µl) gấp khoảng 3 lần E3 (0,91 µg/µl) và 8 lần E1 (0,34 µg/µl). Nồng độ và chất lượng này đủ cho các thí nghiệm cần sử dụng protein tiếp theo.



Hình 8. Kết quả tinh sạch protein bằng phương pháp sắc ký ái lực với Nikel

M: thang chuẩn protein; NC (non-induced control): protein tổng của tế bào không được kích thích biểu hiện protein; Lysate: dịch vi khuẩn sau bước ly giải tế bào; FT

(flow-through): dịch thu được sau khi cho lysate chạy qua cột resin Ni-NTA; W1, 2, 3: các dịch thu được sau các bước rửa 1, 2, 3; E1, 2, 3: dịch rửa giải lần 1, 2, 3.

Bảng 1. Nồng độ của các hỗn hợp protein qua các lần rửa giải

Dung dịch rửa giải	Nồng độ (µg/µl)
E1	0,34
E2	2,61
E3	0,91

4. KẾT LUẬN

OsBHLH061 đã được tạo dòng trong vi khuẩn *E. coli* DH5α và biểu hiện thành công trong vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3). Protein cũng đã được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực nhờ thẻ Histidine dung hợp vào đầu N. Đây sẽ là nguồn protein sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo như protein-binding microarray, EMSA hay các thí nghiệm *in vitro* khác.

LỜI CẢM Ạ

Nghiên cứu này được thực hiện nhờ tài trợ từ Chương trình Next-Generation BioGreen 21 (Yoen-Ki Kim, dự án mã số PJ009484 và PJ008070; Baek-Hie Nahm, dự án mã số PJ008145) và Viện quản lý Phát triển nông thôn Hàn Quốc, Rural Development Administration, RDA of the Republic of Korea.

TÀI LIỆU THAM KHẢO (REFERENCES)

Bervoets, I., & Charlier, D. (2019). Diversity, versatility and complexity of bacterial gene regulation mechanisms: opportunities and drawbacks for applications in synthetic biology. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(3), 304-339. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz001>.

Do, T. T. H., Tran, T. T. A., Nguyen, T. H. V., Nguyen, Q. H., & Nguyen, V. S. (2017). Cloning, expression and purification of NF-κB p50 transcription factor from human using *E. coli* host cell. *VNU Journal of Science: Natural Science and Technology*, 33(1S), 299-304 (in Vietnamese).

He, H., Yang, M., Li, S., Zhang, G., Ding, Z., Zhang, L., Shi, G., & Li, Y. (2023). Mechanisms and biotechnological applications of transcription factors. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 8(4), 565-577. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2023.08.006>.

Hellman, L. M., & Fried, M. G. (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nature Protocols*, 2, 1849-1861. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.249>.

Helwa, R., & Hoheisel, J. D. (2010). Analysis of DNA-protein interactions: from nitrocellulose filter binding assays to microarray studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398, 2551-2561. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4096-7>.

Kim, J. S., Chae, S. H., Jun, K. M., Lee, G.-S., Joen, J.-S. & Kim, K. D., & Kim, Y.-K. (2021). Rice protein-binding microarrays: a tool to detect cis-acting elements near promoter regions in rice. *Planta*, 253, 40. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03572-w>.

Kim, J. S., Chae, S., Jun, K. M., Pahk, Y.-M., Lee, T.-H., Chung, P. J., Kim, Y.-K., & Nahm, B. H. (2017). Genome-wide identification of grain filling genes regulated by the OsSMF1 transcription factor in rice. *Rice*, 10, 16. <https://doi.org/10.1186/s12284-017-0155-4>.

Kim, M. J., Chung, P. J., Lee, T.-H., Kim, T. H., Nahm, B. H., & Kim, Y.-K. (2012). Convenient determination of protein-binding DNA sequences using quadruple 9-mer-based microarray and DsRed-monomer fusion protein. *Methods in Molecular Biology*, 786, 65-77. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-292-2_4.

- Kim, M. J., Lee, T.-H., Pahk, Y.-M., Kim, Y.-H., Park, H.-M., Choi, D. Y., Nahm, B. H., & Kim, Y.-K. (2009) Quadruple 9-mer-based protein binding microarray with DsRed fusion protein. *BMC Molecular Biology*, 10, 91. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-91>.
- Kostylev, M., Otwell, A. E., Richardson, R. E., & Suzuki, Y. (2015). Cloning Should Be Simple: Escherichia coli DH5 α -Mediated Assembly of Multiple DNA Fragments with Short End Homologies. *PLoS One*, 10(9):e0137466. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137466>.
- Li, X., Duan, X., Jiang, H., Sun, Y., Tang, Y., Yuan, Z., Guo, J., Liang, W., Chen, L., Yin, J., Ma, H., Wang, J., & Zhang, D. (2006). Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in rice and Arabidopsis. *Plant Physiology*, 41(4), 1167-84. <https://doi.org/10.1104/pp.106.080580>.
- Nguyen, D., P., Tuteja, N., Ham, L. H., & Pham, X. H. (2012). Expression and purification of recombinant protein NLI-IP from *Escherichia coli*. *Journal of Biology*, 34(3), 347-353 (in Vietnamese).
- Pham, T. M. T. (2014). Characterization of a homeobox transcription factor OsWOX13 induced during acute dehydration in rice. *Dissertation in Biological Science*, Myongji University, Korea.
- Samuelson, J. C. (2011). Recent developments in difficult protein expression: a guide to *E. coli* strains, promoters, and relevant host mutations. *Methods in Molecular Biology*, 705, 195-209. https://doi.org/10.1007/978-1-61737-967-3_11.
- Sofia, C., André, A., António, C., & Lucília, D. (2014). Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Frontiers in Microbiology*, 5, 63. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00063>.
- Tu, Q. L., Vo., N., H., V., Nguyen, T. T., & Tran, V. H. (2022). Cloning, expression and purification of recombinant SCARB2 subunit receptor of enterovirus A71 fused with foldon peptide. *Can Tho University Journal of Science*, 58 (Natural Science), 1-7. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2022.091> (in Vietnamese).
- Young, C. L., Britton, Z. T., and Robinson, A. S. (2012). Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnol. J.* 7, 620–634. <https://doi.org/10.1002/biot.201100155>
- Yuan, S., Zhang, R., Cao, Y., Guo, Y., Xian, M., & Liu, W. (2020). New expression system to increase the yield of phloroglucinol, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 34(1), 405-412. <https://doi.org/10.1080/13102818.2020.1764386>.
- Zuo, Z. F., Lee, H. Y., & Kang H. G. (2023). Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors: Regulators for Plant Growth Development and Abiotic Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1419. <https://doi.org/10.3390/ijms24021419>.