# **TRANG THÔNG TIN LUẬN ÁN**

(khoảng 1 – 1.5 trang A4)

Tên đề tài luận án: “Tạo các protease TEV và HRV3C ở *Bacillus subtilis* dùng cắt loại đuôi dung hợp trong tinh chế protein tái tổ hợp”

Ngành: Vi sinh vật học

Mã số ngành: 9420107

Họ tên nghiên cứu sinh: Lê Dương Vương

Khóa đào tạo: 2018

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Nguyễn Đức Hoàng và PGS.TS. Phan Thị Phượng Trang

Cơ sở đào tạo: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

**1. TÓM TẮT NỘI DUNG LUẬN ÁN**:

Tobbaco Etch Virus (TEV) protease và Human Rhinovirus 3C (HRV3C) protease là những công cụ quan trọng, phổ biến để loại đuôi dung hợp trong quá trình tinh sạch, thu nhận protein tái tổ hợp. Tuy nhiên, hiện nay, phần lớn các nghiên cứu về hai loại protease đều được thực hiện trên *E. coli.* Điều này dẫn đến sự hao phí về thời gian và tiền bạc để loại bỏ endotoxin. Để giải quyết các vấn đề này, đề tài tiến hành biểu hiện nội bào và thu nhận các His-TEV, His-HRV3C và His-GST-HRV3C tinh sạch từ chủng chủ an toàn *B. subtilis* dựa trên promoter P*grac*212 và đuôi dung hợp BsLysSN. Đồng thời, đề tài cũng tạo dòng thu nhận các protein tái tổ hợp chứa protein GFP, đuôi dung hợp có vị trí cắt chuyên biệt của TEV/HRV3C làm cơ chất và xác định hoạt tính protease, các giá trị động học phản ứng cắt của các protease này. Các kết quả nghiên cứu cho thấy His-TEV, His-HRV3C, His-GST-HRV3C biểu hiện trên *B. subtilis* có hoạt tính tương đương với các enzyme thương mại biểu hiện từ *E. coli.* Ngoài ra, đề tài đã ứng dụng His-TEV, His-HRV3C, His-GST-HRV3C trong tinh chế protein GFP tái tổ hợp chứa đuôi dung hợp có vị trí cắt chuyên biệt của TEV/ HRV3C.

**2. NHỮNG KẾT QUẢ MỚI CỦA LUẬN ÁN**:

Sau quá trình hoàn thành luận án, đề tài đã đạt được những kết quả mới sau:

* Đã tạo dòng 3 plasmid để biểu hiện protease; thu nhận và tinh chế thành công 3 protease mang đuôi dung hợp là His-TEV, His-HRV3C và His-GST-HRV3C trong tế bào *B. subtilis*.
* Đã tạo dòng 1 plasmid để biểu hiện cơ chất; thu nhận được 2 protein cơ chất GFP dung hợp với đuôi BsLysSN-Hiscó vị trí cắt chuyên biệt của TEV/HRV3C là BsLysSN-His-CSTEV-GFP, BsLysSN-His-CSHRV3C-GFP.
* Đã đánh giá được hoạt tính, xác định các giá trị động học của phản ứng giữa các protease His-TEV, His-HRV3C, His-GST-HRV3C với cơ chất tương ứng (BsLysSN-His-CSTEV-GFP, BsLysSN-His-CSHRV3C-GFP).
* Sử dụng BsLysSN-His-CSTEV-GFP, BsLysSN-His-CSHRV3C-GFP để chứng minh các protease His-TEV, His-HRV3C, His-GST-HRV3C có thể được dùng để tinh chế protein tái tổ hợp mục tiêu có đuôi dung hợp chứa vị trí cắt chuyên biệt của TEV/HRV3C.

**3.** **CÁC ỨNG DỤNG/ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG TRONG THỰC TIỄN HAY NHỮNG VẤN ĐỀ CÒN BỎ NGỎ CẦN TIẾP TỤC NGHIÊN CỨU**

Ứng dụng His-TEV, His-HRV3C và His-GST-HRV3C biểu hiện từ *B. subtilis* vào phương pháp tinh chế 2 bước và loại đuôi dung hợp cần được tiếp tục phát triển để sản xuất các protein tái tổ hợp dùng trong công nghiệp, nông nghiệp cũng như y dược. Ngoài ra, để tiến tới sản xuất thương mại và thay thế các sản phẩm thương mại biểu hiện từ *E. coli,* các điều kiện biểu hiện His-TEV, His-HRV3C, His-GST-HRV3C của *B. subtilis* cũng cần phải được tối ưu để tăng cường năng suất thu nhận.

|  |  |
| --- | --- |
| **TẬP THỂ CÁN BỘ HƯỚNG DẪN**(Ký tên, họ tên)**Nguyên Đức Hoàng****Phan Thị Phượng Trang** | **NGHIÊN CỨU SINH**(Ký tên, họ tên)**Lê Dương Vương** |

**XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO**

**HIỆU TRƯỞNG**

**THESIS INFORMATION**

Thesis title: Production of TEV and HRV3C proteases in *Bacillus subtilis* for the removal of fusion tags in recombinant protein purification

Speciality: Microbiology

Code: 9420107

Name of PhD Student: Le Duong Vuong

Academic year: 2018

Supervisor: Asc. Prof. Dr. Nguyen Duc Hoang, Asc. Prof. Dr. Phan Thi Phuong Trang

At: VNUHCM - University of Science

**1. SUMMARY**:

Tobacco Etch Virus (TEV) protease and Human Rhinovirus 3C (HRV3C) protease are common and essential tools for removing fusion tags during the purification of recombinant proteins. However, most current studies on these proteases have been conducted in *Escherichia coli*, which leads to increased time and cost associated with endotoxin removal. To solve these limitations, the intracellular expression and purification of His-TEV, His-HRV3C, and His-GST-HRV3C proteases were carried out in the endotoxin-free host *Bacillus subtilis*, utilizing the P*grac*212 promoter and the BsLysSN fusion tag. In addition, the recombinant proteins containing GFP proteinand specific TEV/HRV3C cleavage sites were constructed as substrates to determine these protease’s activity and the kinetics of the cleavage reactions. The results demonstrated that His-TEV, His-HRV3C, and His-GST-HRV3C expressed in *B. subtilis* have similiar activities to the commercial enzymes expressed in *E. coli*. Furthermore, these proteases were successfully applied in the two-step purification of recombinant GFP proteins containing TEV/HRV3C-specific fusion tags.

**2. NOVELTY OF THESIS**:

After completing the PhD. thesis, the research achieved the following new results:

– Three expression plasmids were successfully constructed for the intracellular expression, and three fusion proteases: His-TEV, His-HRV3C, and His-GST-HRV3C expressed by *B. subtilis* were purified.

– One plasmid for expressing GFP substrate was constructed and two substrates, which contain BsLysSN-His tags and specific cleavage sites for TEV or HRV3C proteases, were obtained.

– The activities and cleavage kinetics of the reactions between His-TEV, His-HRV3C, and His-GST-HRV3C proteases and their respective substrates (BsLysSN-His-CSTEV-GFP and BsLysSN-His-CSHRV3C-GFP) were determined.

– BsLysSN-His-CSTEV-GFP and BsLysSN-His-CSHRV3C-GFP were used to prove that the His-TEV, His-HRV3C, and His-GST-HRV3C proteases can be applied for the purification of recombinant target proteins containing CSTEV/HRV3C-specific fusion tags.

**3**. **APPLICATIONS/ APPLICABILITY/ PERSPECTIVE**

The application of His-TEV, His-HRV3C, and His-GST-HRV3C proteases expressed in *Bacillus subtilis* for the two-step purification and fusion tag removal should be further developed for the production of recombinant proteins which would be used for industry, agriculture or medicine. Furthermore, to move toward commercial-scale production and to replace existing commercial products expressed in *E. coli*, the expression conditions of these proteases in *B. subtilis* should be optimized to enhance yield.