

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH**



KHOÁ LUẬN TỐT NGHIỆP

**PHÁT TRIỂN CÁC FLUORESCENT ATP SENSOR
SỬ DỤNG TIÊU ĐƠN VỊ EPSILON CỦA PHÂN TỬ
F₁-ATPASE/SYNTHASE VÀ CÁC BIẾN THỂ
CỦA GREEN FLUORESCENT PROTEIN**

Ngành học: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Niên khoá: 2003-2007

Sinh viên thực hiện: HUỲNH NHẬT PHƯƠNG KIM

Thành phố Hồ Chí Minh

Tháng 9/2007

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH



KHOÁ LUẬN TỐT NGHIỆP

PHÁT TRIỂN CÁC FLUORESCENT ATP SENSOR
SỬ DỤNG TIÊU ĐƠN VỊ EPSILON CỦA PHÂN TỬ
F₁-ATPASE/SYNTHASE VÀ CÁC BIẾN THỂ
CỦA GREEN FLUORESCENT PROTEIN

Giáo viên hướng dẫn
GS. TS. NOJI HIROYUKI
TS. IMAMURA HIROMI
TS. LÊ ĐÌNH ĐÔN

Sinh viên thực hiện
HUỲNH NHẬT PHƯƠNG KIM

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 9/2007

MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING
HO CHI MINH CITY, NONG LAM UNIVERSITY



THESIS FOR ENGINEERING DEGREE

DEVELOPMENT OF FLUORESCENT ATP SENSORS BASED ON F₁-ATPASE/SYNTHASE EPSILON SUBUNIT AND GREEN FLUORESCENT PROTEIN VARIANTS

Instructors

Prof. NOJI HIROYUKI

Dr. IMAMURA HIROMI

Dr. LE ĐINH ĐON

Student

HUYNH NHAT PHUONG KIM

Ho Chi Minh city
September, 2007

LỜI CẢM TẠ

Tôi xin chân thành cảm tạ:

- * Ban Giám hiệu trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh, Ban Chủ nhiệm Bộ môn Công nghệ Sinh học, cùng quý Thầy Cô đã truyền đạt kiến thức cho tôi trong suốt quá trình học tại trường.
- * Quý Thầy Cô ở Bộ môn Công nghệ Sinh học, các cán bộ phòng Đào tạo, phòng Quan hệ quốc tế trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện cho tôi tham gia vào chương trình trao đổi sinh viên ngắn hạn (OUSSEP – Osaka University Short-term Student Exchange Program) tại Đại học Osaka – Nhật Bản.
- * Ủy ban Đối ngoại, Trung tâm Sinh viên Quốc tế Đại học Osaka đã hỗ trợ tôi trong thời gian tham gia chương trình OUSSEP.
- * Giáo sư Noji Hiroyuki, Tiến sĩ Imamura Hiromi (Đại học Osaka), Tiến sĩ Lê Đình Đôn (Đại học Nông Lâm) đã hết lòng hướng dẫn, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực hiện khoá luận.
- * Các Tiến sĩ, nhân viên, sinh viên ở phòng thí nghiệm của Giáo sư Noji đã giúp đỡ, động viên tôi trong quá trình thực tập tại đây.
- * Giáo sư Kitahama Hideko, phó Giáo sư Kondo Sachihiko cùng các nhân viên Phòng Sinh viên Quốc tế, Đại học Osaka đã giúp đỡ, động viên tôi trong quá trình học tập tại trường.
- * Các bạn lớp Công nghệ Sinh học K29 đã giúp đỡ, chia sẻ những vui buồn trong suốt quá trình học cũng như thực hiện khoá luận.

Sinh viên thực hiện,

Huỳnh Nhật Phương Kim.

TÓM TẮT KHOÁ LUẬN

Đề tài “Phát triển các fluorescent ATP sensor, sử dụng tiểu đơn vị Epsilon của phân tử F1-ATPase/synthase và các biến thể của green fluorescent protein” được thực hiện tại phòng thí nghiệm của Giáo sư Noji Hiroyuki, Institute of Scientific and Industrial Research (ISIR), Đại học Osaka, Nhật Bản; thời gian từ tháng 10 năm 2006 đến tháng 8 năm 2007.

Trong đề tài này, các ATeam là phức hợp của CFP nối với tiểu đơn vị ϵ từ *Escherichia coli* (EF1 ϵ), *Bacillus clausii* (BCL ϵ), *Bacillus megaterium* (BME ϵ), *Bacillus pseudofirmus* (BPFE) và monomeric Venus hoặc các circular permuted Venus, được tạo ra bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Theo kết quả đánh giá các cấu trúc này *in vitro*, BME ϵ có ái lực với ATP ở mức millimole. Trong khi đó, BCL ϵ và BPFE có ái lực với ATP trong khoảng vài trăm micromole. Tuy nhiên, ATeam với EF1 ϵ và BPFE có đáp ứng rất thấp với ATP. Nồng độ ATP trong tế bào được cho là nằm trong khoảng dưới millimole đến vài millimole nên các ATeam với BME ϵ và BCL ϵ có thể được sử dụng để xác định nồng độ ATP trong tế bào sống. Trong số các ATeam từ BME ϵ thì ATeam BME-cp173Venus là ATP sensor tốt nhất. ATeam này có hằng số phân ly đối với ATP và Hill coefficient lần lượt là $K'd = 3,36$ và $n = 2,04$. ATeam BCL-nVenus có hằng số phân ly đối với ATP $K'd = 4,12.10^5$ và Hill coefficient $n = 2,2$. Song, ATeam này luôn tồn tại dưới hai dạng: đơn phân tử và đa phân tử. Dạng đa phân tử có ái lực rất thấp với ATP. Để loại bỏ hiện tượng đa phân tử, các đột biến thay thế amino acid trong phân tử BCL ϵ như I9T/V42K/F67N/L78N, P85A, I9T/V42K/F67N/L78N/P85A đã được thử nghiệm nhưng không hiệu quả.

Qua các kết quả đạt được, ATeam BME ϵ -cp173Venus là sensor có thể được sử dụng để chỉ thị nồng độ ATP trong tế bào sống ở mức millimole. Đối với các ATeam từ BCL ϵ , cần nghiên cứu thêm để giải quyết vấn đề về sự kết dính của protein.

ABSTRACT

The thesis name is “Development of an ATP sensor based on ATP synthase epsilon subunit and green fluorescent protein variants”. This thesis was carried out at the laboratory of Professor Hiroyuki Noji, Institute of Scientific and Industrial Research (ISIR), Osaka University, Japan; from October, 2006 to August, 2007.

In this study, I constructed ATeam with ϵ subunit from F_1 -ATPase/synthase of *Escherichia coli* (EF1 ϵ), *Bacillus clausii* (BCL ϵ), *Bacillus megaterium* (BME ϵ), *Bacillus pseudofirmus* (BPF ϵ) and monomeric Venus as well as circular permuted Venuses. ATeams with BME ϵ and BCL ϵ showed fluorescence change after addition of ATP and had affinity to millimolar and hundred micro molar ATP, respectively, whereas ATeam with EF1 ϵ and BPF ϵ did not show significant fluorescence change. ATeam BME-cp173Venus seems the best ATP sensor for intracellular ATP among all constructs with BME ϵ . The apparent dissociation constant and Hill coefficient of ATeam MBE-cp173Venus and ATeam BCL-nVenus are $K'd = 3.36$, $n = 2.04$ and $K'd = 4.12 \cdot 10^5$, $n = 2.2$, respectively. ATeam with BME ϵ was monomeric. In contrast, ATeam with BCL ϵ existed as oligomeric and monomeric forms. The dynamic range of ATeam in oligomeric form is smaller than that of ATeam in monomeric form. To solve the problem of aggregation, mutations (I9T/V42K/F67N/L78N, P85A or I9T/V42K/F67N/L78N/P85A) were introduced, but did not affect.

According to the results of this study, ATeam BME-cp173Venus is the most potential ATP sensor for intracellular ATP detection. Aggregation problem of ATeam with BCL ϵ still remains for future improvement.

MỤC LỤC

	Trang
Lời cảm tạ-----	iii
Tóm tắt khoá luận-----	iv
Abstract -----	v
Mục lục-----	vi
Danh sách các chữ viết tắt-----	viii
Danh sách các bảng-----	x
Danh sách các hình -----	x
Chương 1. MỞ ĐẦU -----	1
1.1. Đặt vấn đề-----	1
1.2. Mục đích và yêu cầu-----	2
1.2.1. Mục đích -----	2
1.2.2. Yêu cầu-----	3
Chương 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU -----	4
Chương 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM -----	7
3.1. Thời gian và địa điểm thực hiện khoá luận-----	7
3.2. Vật liệu -----	7
3.3. Phương pháp thí nghiệm -----	8
3.2.1. Cấu trúc gen -----	8
3.2.1.1. Tiểu đơn vị epsilon (ϵ) của F_0F_1 -ATP synthase-----	8
3.2.1.2. Protein huỳnh quang màu vàng (Venus)-----	9
3.2.1.3. Cấu trúc chung của các ATeam -----	10
3.2.1.4. Nhóm ATeam với $EF1\epsilon$ -----	12

3.2.1.5. Nhóm ATeam với BME ϵ -----	13
3.2.1.6. Nhóm ATeam với BCL ϵ -----	14
3.2.1.7. ATeam BPF ϵ -nVenus-----	16
3.2.2. Kiểm tra cấu trúc của các ATeam-----	16
3.2.2.1. Nhóm ATeam với monomeric Venus (nVenus)-----	16
3.2.2.2. Nhóm ATeam với cpVenus -----	18
3.2.3. Biểu hiện và tinh sạch protein tái tổ hợp -----	18
3.2.4. Đánh giá các ATeam in vitro -----	21
3.2.4.1. Đo quang phổ huỳnh quang của ATeam-----	20
3.2.4.2. Đo timecourse của ATeam-----	22
3.2.4.3. Công thức tính dynamic range-----	22
3.2.4.4. Công thức tính hằng số phân ly -----	22
3.2.4.5. Công thức tính tốc độ đáp ứng với ATP của ATeam -----	23
Chương 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN-----	24
4.1. Kết quả thí nghiệm-----	24
4.1.1. Nhóm ATeam EF1 ϵ -nVenus và ATeam EF1 ϵ -cpVenus -----	24
4.1.2. Kết quả sắc ký lọc gel của ATeam BME-nVenus, BCL-nVenus, BPF-nVenus -----	26
4.1.3. Nhóm ATeam BME-nVenus và ATeam BME-cpVenus-----	27
4.1.5. ATeam BPF-nVenus -----	32
4.1.6. Nhóm ATeam với BCL ϵ -----	33
4.2. Thảo luận-----	42
Chương 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ -----	45
Chương 6. TÀI LIỆU THAM KHẢO -----	48

DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

- ATeam: Adenosine 5'-triphosphate indicator based on epsilon subunit for analytical measurement.
- ATP: Adenosine 5'-triphosphate.
- ADP: Adenosine-5'-diphosphate
- CTP: Cytidine-5'-triphosphate
- GTP: Guanosine-5'-triphosphate
- BCL-nVenus (1): protein thu được từ đỉnh thứ nhất của ATeam BCL-nVenus sau sắc ký lọc gel.
- BCL-nVenus (2): protein thu được từ đỉnh thứ hai của ATeam BCL-nVenus sau sắc ký lọc gel.
- BCL(P85A)-nVenus (1): protein thu được từ đỉnh thứ nhất của ATeam BCL(P85A)-nVenus sau sắc ký lọc gel.
- BCL(P85A)-nVenus (2): protein thu được từ đỉnh thứ hai của ATeam BCL(P85A)-nVenus sau sắc ký lọc gel.
- BCL(I9T/V42K/F67N/L78N/P85A)-nVenus (1): protein thu được từ đỉnh thứ nhất của ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N/P85A)-nVenus sau sắc ký lọc gel.
- BCL(I9T/V42K/F67N/L78N/P85A)-nVenus (2): protein thu được từ đỉnh thứ hai của ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N/P85A)-nVenus sau sắc ký lọc gel.
- FRET: Fluorescence resonance energy transfer.
- GFP: Green-emitting fluorescent protein.

- CFP: Cyan-emitting fluorescent protein.
- YFP: Yellow-emitting fluorescent protein.
- PCR: Polymerase chain reaction.
- SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
- Native-PAGE: Native-polyacrylamide gel electrophoresis
- LB: Luria broth
- Ni – NTA: nickel – nitrilotriacetic acid.

DANH SÁCH CÁC BẢNG

BẢNG	TRANG
Bảng 4.1 Bảng so sánh dynamic range của nhóm ATeam EF1-nVenus và ATeam EF1-cpVenus -----	24
Bảng 4.2 Bảng so sánh dynamic range của nhóm ATeam BME-nVenus và ATeam BME-cpVenus -----	29

DANH SÁCH CÁC HÌNH

HÌNH	TRANG
Hình 2.1 Sơ đồ cấu trúc của Cameleons và hiệu ứng FRET giữa hai phân tử GFP khi Ca^{2+} kết hợp vào calmodulin -----	5
Hình 3.1 A. Sơ đồ cấu trúc của ATP synthase ----- B. Cấu trúc tinh thể của TF_1 - ϵ khi gắn với ATP	9
Hình 3.2 Cấu trúc tinh thể của monomeric Venus -----	10
Hình 3.3 Sơ đồ cấu trúc chung của các ATeam với nVenus và cp Venus -----	11
Hình 3.4 Sơ đồ vector pCEV1-EF ₁ -----	12
Hình 3.5 Sơ đồ vector pRSET-AT1.20 -----	13
Hình 3.6 Các môi được thiết kế để gây đột biến gen BCL ϵ -----	17
Hình 3.7 Nuôi cấy <i>E.coli</i> XL10 trên môi trường thạch LB, 0.1 mg/ml Ampicillin -----	17

Hình 3.8 Kết quả điện di trên gel agarose của pRSET-BCL (I9T/V42K/F67N/L78N)- cpVenus, cắt bởi <i>Cla</i> I và <i>Pst</i> I. -----	18
Hình 3.9 Nuôi cấy <i>E.coli</i> JM109 (DE3) trên môi trường thạch LB, 0.1 mg/ml Ampicillin-----	20
Hình 3.10 Protein ATeam thu được sau khi tinh sạch bằng sắc ký lọc gel-----	21
Hình 4.1 Quang phổ huỳnh quang của nhóm ATeam với $EF_1\epsilon$ ở các nồng độ khác nhau của ATP-----	25
Hình 4.2 So sánh kết quả sắc ký lọc gel của ATeam BME-nVenus, ATeam BCL-nVenus, ATeam BPF-nVneus -----	27
Hình 4.3 Kết quả Native-PAGE của ATeam BCL-nVenus và ATeam BPF-nVenus -----	28
Hình 4.4 Kết quả sắc ký lọc gel của BCL-nVenus (1) và BCL-nVenus (2)-----	28
Hình 4.5 Quang phổ huỳnh quang của nhóm ATeam với BME ϵ ở những nồng độ khác nhau của MgATP -----	30
Hình 4.6 Kết quả đo time-course của ATeam BME-cp173Venus ở các nồng độ xác định của MgATP-----	31
Hình 4.7 Đường cong chuẩn độ với MgATP của ATeam BME-cp173Venus--	32
Hình 4.8 Quang phổ huỳnh quang của ATeam BPF-nVenus-----	33
Hình 4.9 Quang phổ huỳnh quang của ATeam BCL-nVenus -----	34
Hình 4.10 Đường cong chuẩn độ với MgATP của ATeam BCL-nVenus-----	34
Hình 4.11 So sánh đường cong chuẩn độ với MgATP của ATeam BCL-nVenus (1) và BCL-nVenus (2) -----	35

Hình 4.12 Kết quả sắc ký lọc gel của ATeam BCL (I9T/V42K/F67N/L78N)-cp157Venus và ATeam BCL (I9T/V42K/F67N/L78N)-cp173Venus-----	36
Hình 4.13 Quang phổ huỳnh quang của ATeam BCL (I9T/V42K/F67N/L78N)-cp157Venus và ATeam BCL (I9T/V42K/F67N/L78N)-cp173Venus -----	37
Hình 4.14 Kết quả sắp gióng cột của BME ϵ , BPF ϵ và BCL ϵ -----	38
Hình 4.15 Vị trí của Ala85 trong cấu trúc tinh thể của TF $_1\epsilon$ tương ứng với vị trí của Pro85 trong phân tử BPF ϵ và BCL ϵ -----	38
Hình 4.16 Kết quả sắc ký lọc gel của ATeam BCL(P85A)-nVenus-----	39
Hình 4.17 Kết quả sắc ký lọc gel của ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N/P85A)-nVenus—	40
Hình 4.18 Kết quả Native-PAGE của ATeam BCL-nVenus, ATeam BCL(P85A)-nVenus, ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N/P85A)-nVenus-----	41
Hình 4.19 Kết quả đánh giá <i>in vitro</i> của ATeam BCL(P85A)-nVenus và ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N/P85A)-nVenus -----	42

Chương 1

MỞ ĐẦU

1.1 Đặt vấn đề

Adenosine 5'-triphosphate (ATP) là hợp chất cao năng quan trọng nhất, giữ vai trò cung cấp năng lượng trong mọi tế bào sống. Bởi vì trong phân tử ATP có hai liên kết phosphate cao năng, năng lượng tự do sẽ được giải phóng khi ATP bị thủy phân thành Adenosine 5'-diphosphate (ADP) và một phosphate vô cơ (Pi), hoặc Adenosine monophosphate (AMP) và pyrophosphate (PPi). Do đó, phần lớn các hoạt động sống như vận chuyển, hấp thu dinh dưỡng, sinh tổng hợp các chất, phân chia tế bào ... đều sử dụng ATP như nguồn năng lượng trực tiếp và tiện dụng. Tuy nhiên, việc đo lường nồng độ ATP trong tế bào sống vẫn còn gặp nhiều khó khăn.

Nhằm theo dõi trực tiếp sự thay đổi nồng độ ATP trong tế bào sống, Tiến sĩ Imamura Hiromi đã đưa ra khái niệm “fluorescent ATP sensor” (protein chỉ thị nồng độ ATP bằng huỳnh quang), còn được gọi là ATeam, dựa trên kỹ thuật FRET. ATeam là một chuỗi polypeptide đơn có cấu tạo gồm protein phát huỳnh quang màu lam (cyan-emitting fluorescent protein - CFP), tiểu đơn vị epsilon (ϵ) của phân tử F1-ATPase/synthase và protein phát huỳnh quang màu vàng (yellow-emitting fluorescent protein - YFP).

ATeam có thể được sử dụng trong các nghiên cứu về ATP như: mối liên quan giữa sự thay đổi nồng độ ATP và chu kỳ tế bào, apoptosis, sự giải phóng Insulin của tế bào β trong đảo Langerhans ở thận...; nghiên cứu nồng độ ATP trong tế bào chất và các bào quan; nghiên cứu sự tổng hợp ATP của một ti thể sử dụng microchamber; nghiên cứu sự tổng hợp hoặc thủy phân ATP bởi một phân tử F1ATPase/synthase sử dụng microchamber...

1.2 Mục đích và yêu cầu

1.2.1. Mục đích

Trong những nghiên cứu trước, tiến sĩ Imamura đã tạo các ATeam là protein tái tổ hợp gồm CFP, tiểu đơn vị ϵ từ thermophilic *Bacillus* PS3 (TF₁- ϵ) và Venus (một thành viên trong nhóm YFP). Tuy nhiên, TF₁- ϵ có ái lực rất cao với ATP, TF₁- ϵ nhạy với ATP dù chỉ ở nồng độ vài micromole. Trong khi đó, nồng độ ATP trong tế bào sống thường được cho là ở mức millimole.

Do đó, mục đích của khoá luận này là:

- Sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để tạo ra các protein tái tổ hợp ATP sensor có ái lực với ATP thấp hơn, có khả năng chỉ thị ATP ở các nồng độ khác nhau.
- Kiểm tra, đánh giá sự thay đổi cường độ huỳnh quang của các ATP sensor này ở các nồng độ khác nhau của ATP bằng Spectrofluorometer.

Trong khoá luận, các tiểu đơn vị ϵ của F₁-ATPase/synthase từ *Escherichia coli* (EF1 ϵ), *Bacillus clausii* (BCL ϵ), *Bacillus megaterium* (BME ϵ), *Bacillus pseudofirmus* (BPF ϵ) đã được thử nghiệm để tạo ATP sensor. Bên cạnh đó, ngoài monomeric Venus, các circular permutated Venus cũng được sử dụng để cải thiện khoảng biến đổi cường độ huỳnh quang giữa nồng độ ATP bằng không (0) và nồng độ ATP bão hoà (dynamic range).

Một ATP sensor (ATeam) phải thoả mãn các điều kiện sau:

- Là một protein đơn phân tử.
- Có ái lực với ATP trong khoảng nồng độ từ dưới millimole đến millimole, bởi vì nồng độ ATP trong tế bào sống thường nằm trong khoảng này (theo Iino và ctv., 2005)
- Chỉ gắn chuyên biệt với ATP.
- Sự thay đổi tín hiệu FRET khi ATeam kết hợp với ATP phải lớn, dễ dàng nhìn thấy được.

1.2.2. Yêu cầu

- Cấu trúc được các phân tử DNA tái tổ hợp bao gồm CFP, ϵ và Venus bằng kỹ thuật sinh học phân tử.
- Biểu hiện các DNA tái tổ hợp này trong tế bào *E.coli* và tinh sạch các protein ATeam.
- Kiểm tra ái lực với ATP của các ATeam bằng Spectrofluorometer.
- Tính toán hằng số phân ly đối với ATP, Hill coefficient (nếu có), tốc độ đáp ứng đối với ATP ở các nồng độ xác định.

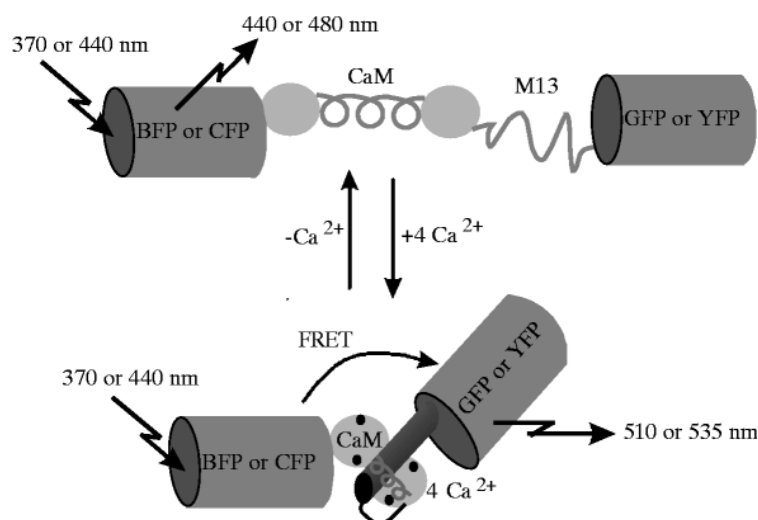
Chương 2

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Kỹ thuật FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer): FRET dựa trên nguyên tắc chuyển năng lượng từ một phân tử phát huỳnh quang (donor) sang một phân tử nhận huỳnh quang (acceptor) khi hai phân tử huỳnh quang này có khoảng cách rất gần nhau (1-10 nm). Sự chuyển năng lượng sẽ làm giảm khả năng phát quang của donor và làm tăng cường độ huỳnh quang của acceptor (theo Gerald Karp, *Cell and Molecular biology*, 2005).

Khái niệm về “fluorescent ATP sensor” bắt nguồn từ “protein chỉ thị nồng độ Calcium bằng huỳnh quang – Cameleons”, được phát triển bởi A.Miyawaki và ctv. (1997). Phân tử protein chỉ thị nồng độ Ca^{2+} là một phức hợp gồm protein huỳnh quang phát màu xanh da trời (blue-emitting fluorescent protein, BFP) hoặc màu xanh lam (CFP), calmodulin, calmodulin-binding peptide M13 và protein phát huỳnh quang màu xanh lá cây (green-emitting fluorescent protein, GFP) hoặc màu vàng (YFP). Sự kết hợp của Ca^{2+} làm cho calmodulin cuộn xung quanh M13, làm gia tăng hiệu ứng FRET giữa hai phân tử huỳnh quang (Hình 2.1). Các tác giả của báo cáo trên cho rằng cameleons có thể đo được Ca^{2+} tự do trong khoảng từ 10^{-8} đến $10^{-12}M$.

Vào năm 2003, Kato-Yamada và Yoshida đã báo cáo rằng tiểu đơn vị ϵ được phân lập từ F1-ATPase của thermophilic *Bacillus* PS3 ($TF_1\text{-}\epsilon$) có khả năng kết hợp với ATP nhưng lại không có khả năng gắn với các nucleotide khác như GTP, UTP, CTP và ADP. Các tác giả kết luận, tiểu đơn vị ϵ có khả năng hoạt động như là một sensor cảm ứng nồng độ ATP trong tế bào.



Hình 2.1. Sơ đồ cấu trúc của Cameleons và hiệu ứng FRET giữa hai phân tử GFP khi Ca^{2+} kết hợp vào calmodulin (theo Miyawaki và ctv., 1997).

Theo Iino và ctv. (2005), đầu C của tiểu đơn vị ϵ gồm hai cấu trúc xoắn α , hai xoắn α này có thể chuyển từ dạng duỗi thẳng sang dạng co lại khi kết hợp với ATP. Các tác giả đã báo cáo rằng ái lực của ATP đối với $\text{TF}_1\text{-}\epsilon$ cao hơn khoảng 100 lần so với ADP và ái lực của GTP thì thấp hơn rất nhiều so với ATP. Gần đây, việc xác định cấu trúc tinh thể của $\text{TF}_1\text{-}\epsilon$ khi gắn với ATP đã chỉ ra rằng ATP gắn vào cấu trúc kẹp tóc của hai chuỗi xoắn α của tiểu đơn vị ϵ khi hai chuỗi này ở dạng co lại (Yagi và ctv., 2007).

Hiệu ứng FRET không chỉ phụ thuộc vào sự gói lên nhau một cách hợp lý về quang phổ giữa donor và acceptor mà còn phụ thuộc vào khoảng cách và sự định hướng tương đối giữa hai phân tử huỳnh quang (theo Miyawaki, 2003). Thật vậy, theo Nagai và ctv. (2004), dynamic range của protein chỉ thị nồng độ Ca^{2+} (Cameleons) có thể được mở rộng bằng cách thay đổi sự định hướng tương đối giữa hai phân tử huỳnh quang sử dụng các circularly permuted yellow fluorescent protein (cpYFPs). Trong các phân tử cpYFP, đầu N và đầu C nguyên thủy được nối lại với nhau bởi một cầu nối ngắn, đồng thời, đầu N và đầu C mới được tạo ra.

Các tác giả nhận định rằng, một trong các cpYFP hấp thu một lượng lớn năng lượng kích thích từ CFP, dẫn đến sự thay đổi dynamic range đến gần 600%.

Từ các nghiên cứu trên, chúng tôi xây dựng phân tử “fluorescent ATP sensor” để đo nồng độ ATP trong tế bào, sử dụng kỹ thuật FRET và tiểu đơn vị ϵ từ F1-ATPase/synthase. Trong đó, phân tử ϵ sẽ nằm giữa hai phân tử huỳnh quang: CFP đóng vai trò là chất phát huỳnh quang và Venus hay các cpVenus đóng vai trò là chất nhận huỳnh quang.

Chương 3

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

3.1. Thời gian và địa điểm thực hiện khoá luận

- Thời gian: 19/10/2006 – 7/8/2007
- Địa điểm: Phòng thí nghiệm của giáo sư Noji Hiroyuki, Institute of Scientific and Industrial Research (ISIR), đại học Osaka, Nhật Bản.

3.2. Vật liệu

- | | |
|--|--|
| + Plasmid pRA100 EF ₀ F ₁ | + Enzyme Sall (Roche) |
| + Bacillus clausii | + Dung dịch đệm H (Roche) |
| + Bacillus megaterium | + Dung dịch đệm B (Roche) |
| + Bacillus pseudofirmus | + Dung dịch TrisHCl 1 M (pH 8.0) |
| + Monomeric Super enhanced CFP | + Dung dịch NaCl 5 M |
| + Monomeric Venus | + Dung dịch MOPS – KOH 0.2 M (pH 7.5) |
| + Circular permutated Venus:
cp50Venus,
cp157Venus, cp173Venus,
cp195Venus, cp229Venus. | + Dung dịch KCl 2.5 M
+ Dung dịch MgCl ₂ 2 M |
| + Plasmid pCEV1 | + Bột BSA |
| + Plasmid pRSET – AT1.20 | + Dung dịch Triton X100 10% |
| + E.coli XL10 (Stratagene) | + Dung dịch ATP – Na 231 mM |
| + E.coli JM109 (DE3) (Stratagene) | + Dung dịch đệm 0.1 M NaPi (pH 8.0) |
| + Enzyme EcoRI (Roche) | 0.2 M NaCl, 10mM imidazol |
| + Enzyme ClaI (Roche) | + Dung dịch đệm 0.1 M NaPi (pH 8.0) |
| + Enzyme PstI (Roche) | 0.2 M NaCl, 200mM imidazol |
| + Enzyme HindIII (Roche) | |

- + Môi trường LB
- + Bột Ampicillin
- + Dung dịch IPTG 100 mM
- + PrimeSTAR HS DNA polymerase (TaKaRa)
- + dNTPs (2.5 mM mỗi loại) (TaKaRa)
- + λ -EcoT14I DNA marker (TaKaRa)
- + Ligation mix (TaKaRa)
- + BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystem)
- + Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices (30k) (Millipore)
- + Wizard Kit (Promega)
- + QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)
- + Ni – NTA resin
- + Cột sắc ký Superdex 200 (Amersham Biosciences)
- + Máy PCR (Eppendorf)
- + Máy ly tâm
- + Máy giải trình tự DNA ABI 310 (Applied Biosystem)
- + Máy phá vỡ tế bào bằng sóng âm (sonication)
- + Máy Spectrofluorometer FP – 6500 (Jasco, Nhật Bản)
- + Phần mềm PyMOL
- + Phần mềm Sequence Scanner v1.0
- + Phần mềm Genetyx v4.0
- + Phần mềm KaleidaGraph v3.51

3.3. Phương pháp thí nghiệm

3.3.1. Cấu trúc gen

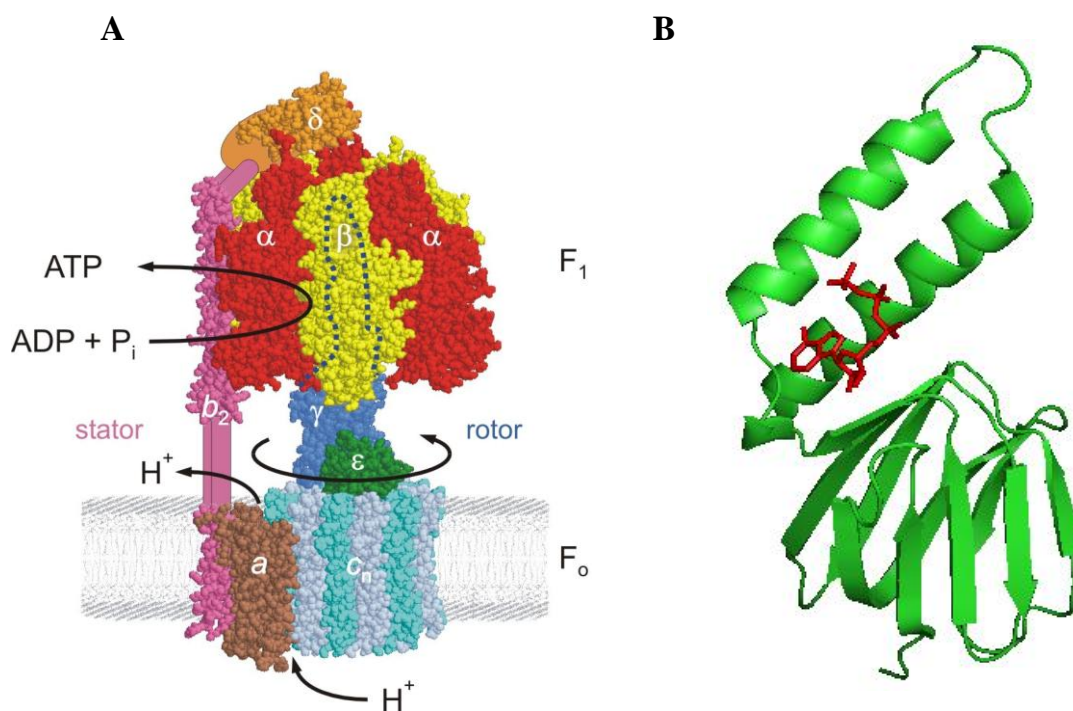
3.3.1.1. Tiểu đơn vị epsilon (ϵ) của F_0F_1 -ATP synthase

Enzyme xúc tác sự tổng hợp ATP trong ti thể, F_0F_1 -ATP synthase, là một phức hợp protein có dạng hình nấm với hai thành phần cơ bản:

- F_0 có hình trụ, kị nước, gắn vào màng trong ti thể, là kênh proton. F_0 có cấu trúc các tiểu đơn vị như sau $a_1b_2c_{10-14}$. Tiểu đơn vị b kéo dài đến phần đầu F_1 tạo thành một cuống.

– F_1 có hình cầu, ưa nước, nhô ra matrix, là phần xúc tác của enzyme. F_1 được phân lập có hoạt tính thủy phân ATP. F_1 bao gồm 5 tiểu đơn vị khác nhau có cấu trúc $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$, tiểu đơn vị γ chèn vào giữa vòng $\alpha_3\beta_3$ và nối với phần F_0 . (Hình 3.1A)

Tiểu đơn vị ϵ là một tiểu đơn vị nhỏ, khoảng 130-140 amino acid, gồm hai phần riêng biệt, đầu N có dạng xếp lớp β và đầu C có cấu trúc xoắn α . Theo Yagi và ctv., 2007, dựa vào cấu trúc tinh thể của TF_1 - ϵ khi gắn với ATP, hai chuỗi xoắn α của đầu C hình thành cấu trúc kẹp tóc, nằm lên trên phần cấu trúc β . Các tác giả cho rằng, hai chuỗi xoắn này chỉ hình thành dạng kẹp tóc khi có mặt ATP và khi không có mặt ATP, hai chuỗi xoắn này lại ở dạng duỗi thẳng. (Hình 3.1B). Do tính chất này, ϵ có thể hoạt động như một ATP sensor trong tế bào.



Hình 3.1. A. Sơ đồ cấu trúc của ATP synthase. (J.Weber)

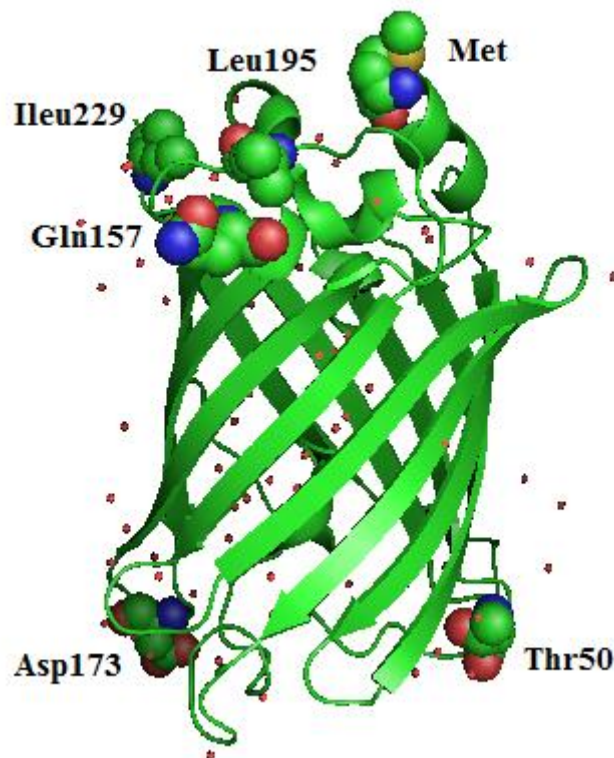
B.Cấu trúc tinh thể của TF_1 - ϵ khi gắn với ATP.

Phân tử ATP có màu đỏ (Yagi và ctv.,2007)

3. 3.1.2. Protein huỳnh quang màu vàng (Venus)

Venus là một thành viên trong nhóm protein huỳnh quang màu vàng (YFPs) - một dạng đột biến về màu sắc của GFP từ loài sứa *Aequorea victoria*. Venus mang các đột biến F64L/M153T/V163A/S175G giúp phân tử này được biểu hiện dễ dàng hơn, chịu được acid và ion Cl^- .

Circularly permuted Venus là phân tử mà trong đó đầu N và đầu C tự nhiên được nối bởi một cầu nối ngắn, đồng thời, hình thành đầu N và đầu C mới tại vị trí khác trong phân tử. Tôi đã nhận được 5 loại cpVenus từ tiến sĩ Imamura: cp50Venus có đầu N ở vị trí Threonine 50, cp157Venus có đầu N mới ở vị trí Glutamine 157, cp173Venus có đầu N mới ở vị trí Aspartic acid 173, cp195 có đầu N mới ở vị trí Leucine 195 và cp229Venus có đầu N mới ở vị trí Isoleucine 229 (Hình 3.2).



Hình 3.2. Cấu trúc tinh thể của monomeric Venus. (A. Rekas và ctv., 2002)

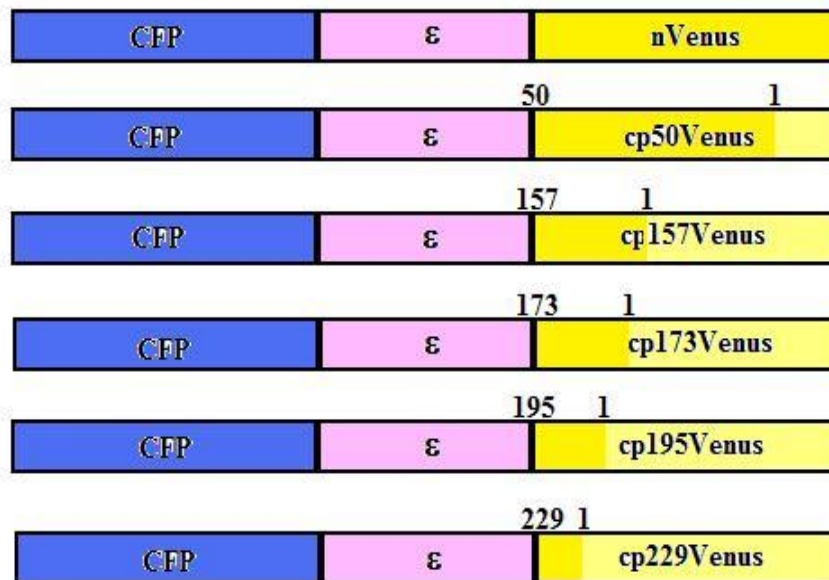
Vị trí của Met và các đầu N mới trong phân tử cpVenus đã được xác định

3.3.1.3. Cấu trúc chung của các ATeam

Trong khoá luận này, các ATeam là phức hợp gồm tiểu đơn vị ϵ từ các loại vi khuẩn khác nhau như *E.coli* (EF1 ϵ), *B. clausii* (BME ϵ), *B. megaterium* (BCL ϵ), *B. pseudofirmus* (BPFe) nằm giữa phân tử CFP và monomeric Venus (nVenus) hoặc các circular permuted Venus (cpVenus). Cấu trúc chung của các ATeam được trình bày trong hình 3.3.

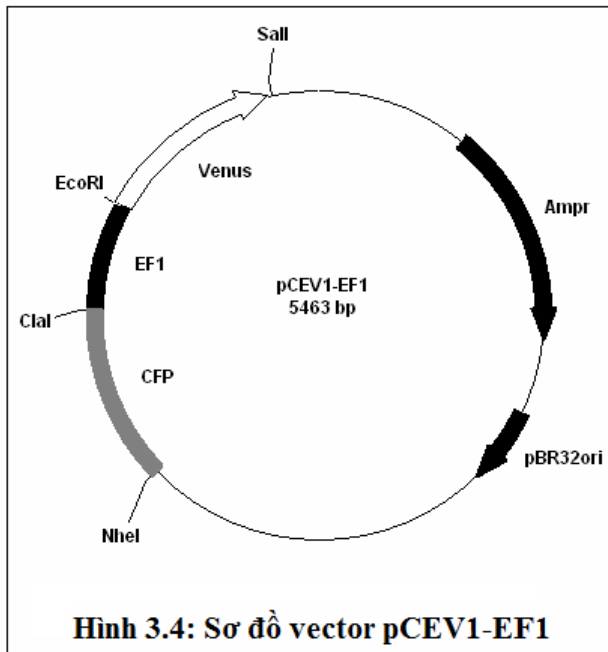
Lưu ý rằng đã có những sai sót trong quá trình tạo các cpVenus được sử dụng cho nhóm ATeam với EF1 ϵ . Các cpVenus đã dùng là cp49Venus, cp156Venus, cp172Venus, cp194Venus, cp228Venus. Nguyên nhân của những sai sót này là do, trong phân tử GFP, amino acid thứ hai-Valine-thường được gọi là Val-1'. Điều đó có nghĩa là, ví dụ như trong phân tử cp157Venus, amino acid đầu tiên (sau amino acid mở đầu Met) phải là amino acid thứ 158-Glutamine (Gln-157) chứ không phải amino acid thứ 157-Lysine (Lys-156).

Mặt khác, trong các nhóm ATeam với BME ϵ , BCL ϵ , cp229Venus đã không được sử dụng. Nguyên nhân là do phần phía sau Ile229 là một cấu trúc linh động, không ổn định, do đó việc sử dụng cp229Venus không mang lại hiệu quả.



Hình 3.3. Sơ đồ cấu trúc chung của các ATeam với nVenus và cpVenus.

3.3.1.3. Nhóm ATeam với EF1ε



Gen EF1ε được khuếch đại nhờ phản ứng PCR sử dụng plasmid pRA100 EF₀F₁ có chứa EF₀F₁ operon làm khuôn mẫu, PrimeSTAR HS DNA polymerase (TaKaRa). Mỗi xuôi mang vị trí cắt của enzyme *Clal* và mỗi ngược mang vị trí cắt của enzyme *EcoRI*, giúp kết hợp vị trí cắt của hai enzyme này vào sản phẩm PCR.

Sau đó sản phẩm PCR được tinh sạch và cắt bởi enzyme cắt giới hạn *Clal* và *EcoRI* (Roche). Gen được gắn vào vị trí *Clal/EcoRI* của vector pCEV1 (được thiết kế bởi tiến sĩ Imamura từ pET23) để tạo một vector tái tổ hợp chứa CFP-EF1ε-nVenus (Hình 3.4).

Các ATeam EF1-cpVenus được tạo ra bằng cách thay thế nVenus của ATeam EF1ε-nVenus bằng cp49Venus, cp156Venus, cp172Venus, cp194Venus, cp228Venus.

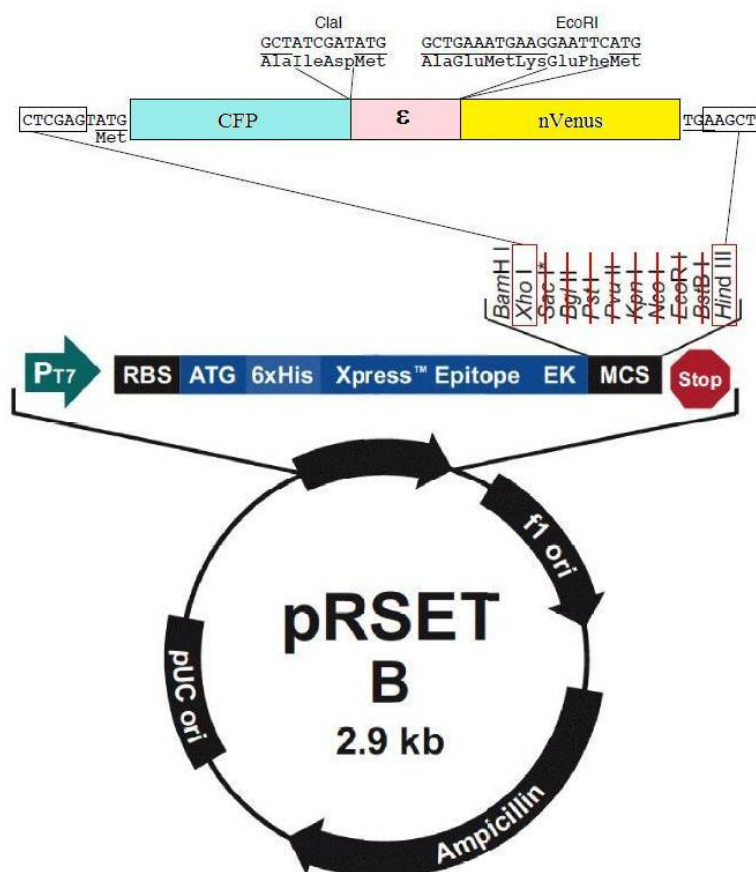
3.3.1.4. Nhóm ATeam với BMEε

Trình tự gen của BMEε được tìm trong ngân hàng gen của NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA), sử dụng công cụ PSI-BLAST bằng cách nhập vào trình tự của TF₁-ε.

Sau đó, gen BMEε được khuếch đại nhờ phản ứng PCR, sử dụng genomic

DNA của *B.megaterium* làm khuôn mẫu và enzyme PrimeSTAR HS DNA polymerase (TaKaRa). Mỗi xuôi mang vị trí cắt của enzyme *Cla*I và mỗi ngược mang vị trí cắt của enzyme *Eco*RI, giúp kết hợp vị trí cắt của hai enzyme này vào sản phẩm PCR. Sản phẩm PCR được tinh sạch và cắt bởi hai enzyme cắt giới hạn *Cla*I và *Eco*RI, sau đó được chuyển vào vị trí *Cla*I/*Eco*RI của vector pRSET-AT1.20 (được thiết kế bởi tiến sĩ Imamura từ vector pRSET_B (Invitrogen)). (Hình 3.4)

A_{Team} BME ϵ -cpVenus được tạo ra bằng cách thay thế nVenus trong A_{Team} BME ϵ -nVenus bằng các cpVenus.



Hình 3.5: Sơ đồ vector pRSET-AT1.20 (Imamura, 2007).

Lý do thay đổi từ vector pCEV1 sang vector pRSET:

- Vector pRSET có pUC ori, do đó vector này có số lượng copy cao hơn

so với vector pCEV1 với pBR322 ori.

- Vùng đầu C của tiểu đơn vị ϵ được cho là rất cần thiết để gắn với ATP (theo Kato-Yamada và Yoshida, 2003). Trong pCEV1, đuôi Histidine (His-tag) được gắn vào đầu C của Venus, trong không gian, vị trí này rất gần với đầu C của ϵ . His-tag có thể ảnh hưởng đến sự thay đổi hình thể của ϵ để gắn với ATP. Trong những cấu trúc với pRSET, His-tag được gắn vào đầu N của CFP, cách xa đầu C của tiểu đơn vị ϵ .
- Vector pRSET mang vị trí cắt của enzyme *XhoI* và *HindIII*, có thể được sử dụng để chuyển trực tiếp cDNA của ATeam vào vector pcDNA3.1, để biểu hiện ATeam trong tế bào động vật hữu nhũ. Điều này giúp tiết kiệm thời gian nhờ bỏ qua các bước PCR và giải trình tự.

3.3.1.5. Nhóm ATeam với BCL ϵ

Trình tự của tiểu đơn vị ϵ từ F_1 -ATPase/synthase của *B.clausii* KSM-K16 được tìm trên ngân hàng gen của NCBI bằng công cụ PSI-BLAST, bằng cách nhập vào query trình tự của TF1 ϵ .

* ATeam BCL-nVenus

Gen BCL ϵ được khuếch đại nhờ phản ứng PCR, sử dụng genomic DNA của *B.clausii* làm khuôn mẫu và enzyme PrimeSTAR HS DNA polymerase (TaKaRa), tương tự BME ϵ . Sản phẩm PCR được tinh sạch và cắt bởi hai enzyme cắt giới hạn *ClaI* và *EcoRI*, sau đó được chuyển vào vị trí *ClaI/EcoRI* của vector pRSET-AT1.20.

* ATeam BCL(P85A)-nVenus

Sự thay thế Proline ở vị trí 85 bằng Alanine được thực hiện qua hai bước PCR với PrimeSTAR HS DNA polymerase, BCL ϵ làm khuôn mẫu. Phản ứng PCR thứ nhất dùng để khuếch đại phần 5' của gen BCL ϵ . Mồi xuôi mang vị trí cắt của enzyme *ClaI*, mồi ngược chứa anticodon của Alanine ở vị trí thứ 85.

Trong phản ứng PCR thứ hai, phần 3' của gen BCL ϵ được khuếch đại với môi xuôi chứa codon mã hoá cho Alanine ở vị trí thứ 85 và môi ngược mang vị trí cắt của *EcoRI*. Sau đó, toàn bộ gen BCL ϵ , mang đột biến P85A, được khuếch đại nhờ phản ứng PCR với môi xuôi và môi ngược lần lượt mang vị trí cắt của *ClaI* và *EcoRI* và sản phẩm PCR của hai lần PCR trước được sử dụng làm khuôn mẫu. (Hình 3.5)

Sản phẩm PCR sau cùng được tinh sạch và cắt bởi *ClaI* và *EcoRI*, sau đó được chuyển vào vector pRSET-AT1.20.

* ATeam BCL (I9T/V42K/F67N/L78N) - nVenus, ATeam BCL (I9T/V42K/F67N/L78N) - cpVenus và ATeam BCL (I9T/V42K/F67N/L78N/P85A) - nVenus

Tạo đột biến thay thế 4 amino acid I9T, V42K, F67N, L78N được thực hiện tương tự như trong phần thay thế P85A. Các đột biến này được thực hiện qua 4 bước PCR với PrimeSTAR HS DNA polymerase, gen BCL ϵ là khuôn mẫu. Bước PCR thứ nhất dùng để khuếch đại phần 5' của BCL ϵ với môi xuôi chứa codon mã hoá cho Threonine (T) ở vị trí thứ 9 và mang vị trí cắt của *ClaI*, môi ngược chứa anticodon của Asparagine (N) ở các vị trí 67 và 78. Phần 3' của BCL ϵ được khuếch đại trong phản ứng PCR thứ hai, nhờ môi xuôi mang codon của Asn ở vị trí 67 và 78, môi ngược mang vị trí cắt của *EcoRI*. Sau đó, sản phẩm của hai phản ứng PCR trên được nối lại và khuếch đại với môi xuôi *ClaI*-I9T và môi ngược *EcoRI*.

Phản ứng PCR thứ 3 được thực hiện để thay Valine42 bằng Lysine, phần 5' của BCL ϵ (I9T/F67N/L78N) được khuếch đại với môi xuôi *ClaI*-I9T và môi ngược V42K. Phần 3' được khuếch đại bằng môi xuôi V42K với codon mã hoá cho Lys ở vị trí 42 và môi ngược có vị trí cắt của *EcoRI*. Tiếp theo, chuỗi DNA của BCL ϵ mang cả 4 đột biến (I9T/V42K/F67N/L78N) được nhân lên bằng cách sử dụng hai sản phẩm PCR trên làm khuôn mẫu và môi xuôi *ClaI*-I9T, môi ngược *EcoRI*. Cuối cùng, chuỗi DNA BCL ϵ (I9T/V42K/F67N/L78N) được cắt bởi *ClaI*,

EcoRI và chuyển vào vector pRSET-AT1.20.

Các ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N)-cpVenus được tạo bằng cách thay thế nVenus trong ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N)-nVenus bằng các cpVenus.

ATeam BCL (I9T/V42K/F67N/L78N/P85A)-nVenus được thực hiện với cùng phương pháp như ATeam BCL(P85A)-nVenus, sử dụng BCL ϵ (I9T/V42K/F67N/L78N) làm khuôn mẫu.

Các môi được sử dụng để gây các đột biến trong phần này được trình bày ở hình 3.5.

3.3.1.6. ATeam BPF ϵ -nVenus

Trình tự của BPF ϵ cũng được tìm trong ngân hàng gen của NCBI nhờ công cụ PSI-BLAST. Sử dụng phản ứng PCR để khuếch đại đoạn gen này từ genomic DNA của *Bacillus pseudofirmus*, tương tự như với BME ϵ và BCL ϵ đã trình bày ở trên. Sau đó, sản phẩm PCR cũng được tinh sạch, cắt bởi *ClaI*, *EcoRI* và chuyển vào vector pRSET-AT1.20.

3.3.2. Kiểm tra cấu trúc của các ATeam

3.3.2.1. Nhóm ATeam với monomeric Venus (nVenus)

Sau ligation bằng Ligation mix (TaKaRa), plasmid DNA được chuyển vào tế bào *E.coli* XL10 và nuôi cấy trên thạch LB có 0.1mg/ml Ampicillin để sàng lọc các tế bào có chứa plasmid. Các đĩa thạch được ủ ở 37⁰C, qua đêm (Hình 3.7)

Sau đó, *E.coli* XL10 được nuôi cấy theo từng khuẩn lạc riêng rẽ trong 5 ml môi trường LB để thu nhận plasmid. Plasmid được tinh sạch từ tế bào *E.coli* bằng cách thủ công (xem phụ lục) hoặc bằng QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN).

Trình tự DNA của tiểu đơn vị ϵ được kiểm tra bằng cách giải trình tự, sử dụng plasmid làm khuôn mẫu, BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystem) và ABI 310 DNA analyzer (Applied Biosystem). Sau đó, kết quả giải trình tự được kiểm tra trên máy tính nhờ phần mềm Sequence Scanner

v1.0 và Genetyx v4.0.

Mồi xuôi B.CL *Cla*I-19T:

CCATCGATGTGGCAACGATACAAGTCAGTGTCACCACGCCTGACG
*Cla*I Thr

Mồi xuôi B.CL V42K:

CATATTCCGCTTAAGAGTCCGCTTGC
Lys

Mồi ngược B.CL V42K:

GTATAAGGCGAATTCTCAGGCGAACG
Lys

Mồi xuôi B.CL F67N/L78N:

GTTTCGAGCGGTAATGTAGAAGTCAGGCCAGACCATGTCTCTATTAATGCCGAGGCGG
Asn Asn

Mồi ngược B.CL F67N/L78N:

CAAAGCTCGCCATTACATCTTCAGTCCGGTCTGGTACAGAGATAATTACGGCTCCGCC
Asn Asn

Mồi xuôi B.CL P85A:

GGCCGAACGTGCCGAGCAAATTG
Ala

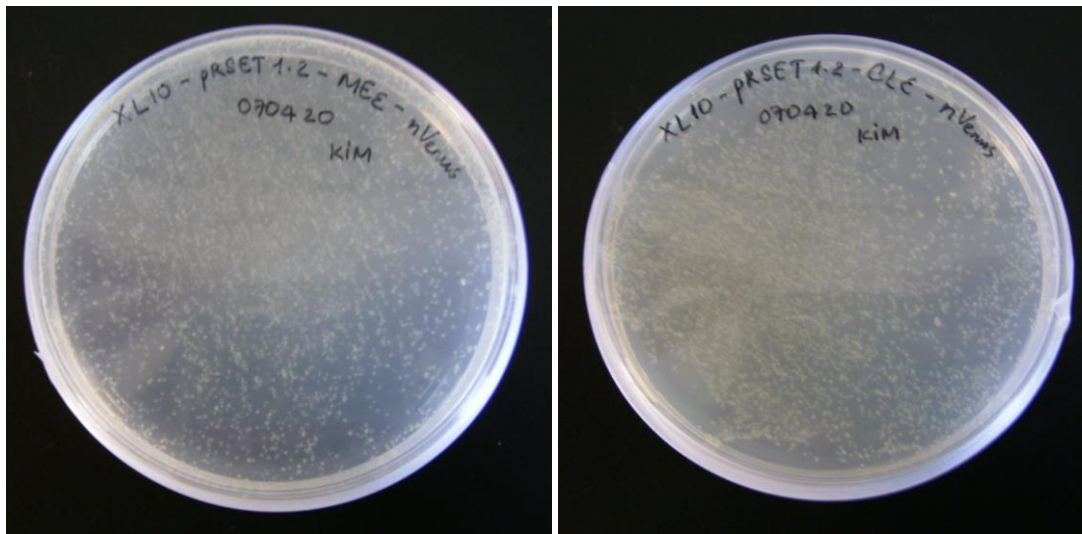
Mồi ngược B.CL P85A:

CCGGCTTGCACGGCTCGTTTAAC
Ala

Mồi ngược B.CL *Eco*RI:

GCGAATTCTGCGCCTTTATGTTTGGCGAC
*Eco*RI

Hình 3.6. Các mồi được thiết kế để gây đột biến gen BCL ϵ

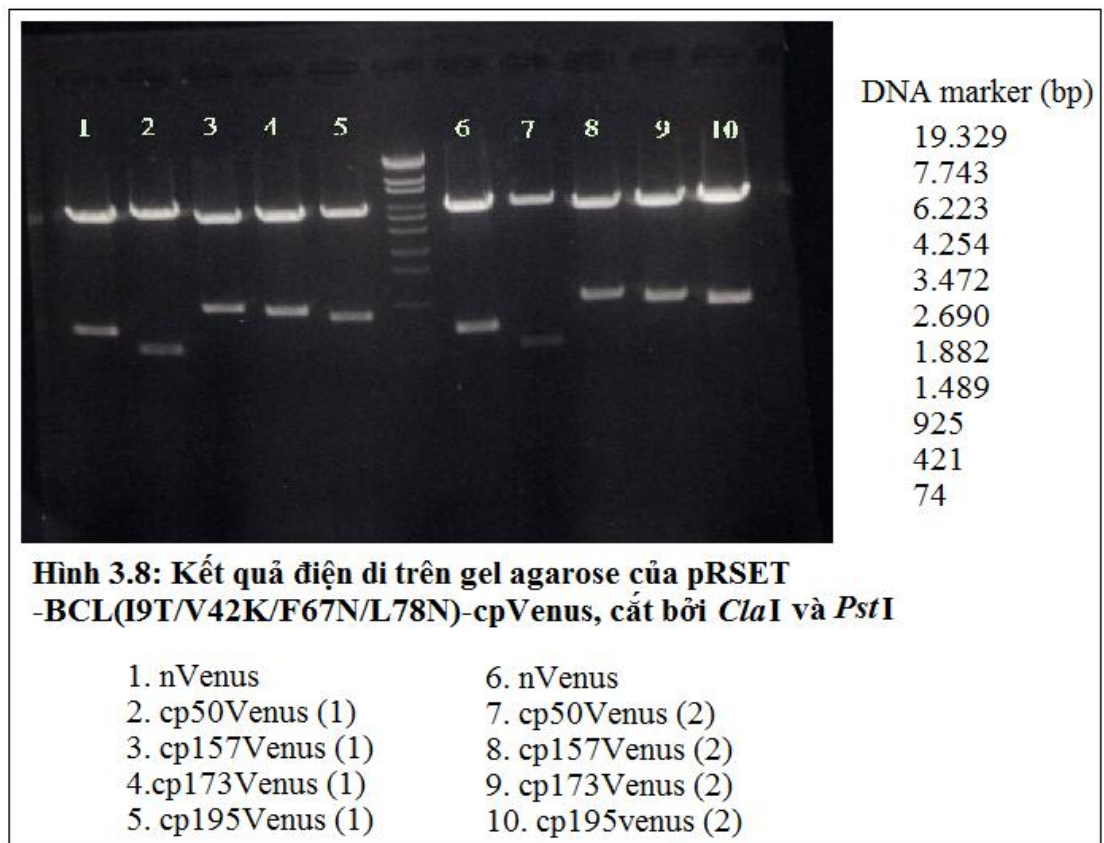


Hình 3.7. Nuôi cấy *E.coli* XL10 trên môi trường thạch LB, 0.1 mg/ml Ampicillin.

3.3.2.2. Nhóm ATeam với cpVenus

Để kiểm tra các cpVenus, plasmid được cắt bởi enzyme cắt giới hạn *ClaI* và *PstI* (Roche). Bởi vì trong phân tử DNA của Venus có một vị trí cắt duy nhất của *PstI*, plasmid bị cắt bởi *ClaI* và *PstI* sẽ tạo ra các đoạn DNA có chiều dài khác nhau tùy thuộc vào các loại cpVenus khác nhau. Các đoạn DNA sẽ được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% (Hình 3.6).

Chiều dài các đoạn DNA tạo thành do ϵ và cpVenus sau khi cắt plasmid với *ClaI* và *PstI*: nVenus: 618 bp; cp50Venus: 470 bp; cp157Venus: 885 bp; cp173Venus: 837 bp; cp195Venus: 771 bp.

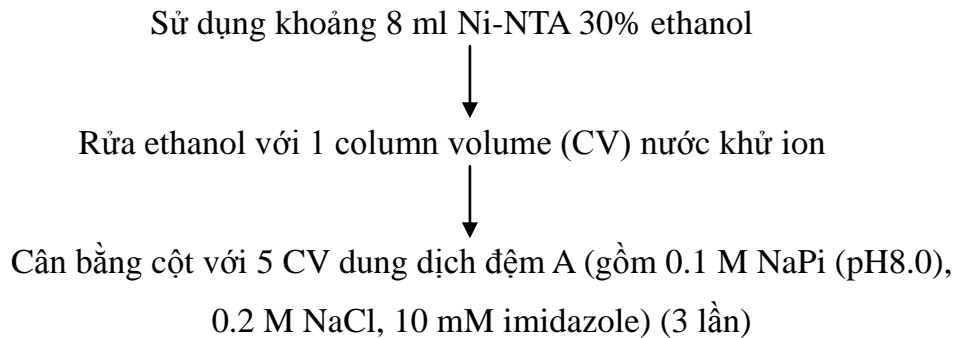


3.3.3. Biểu hiện và tinh sạch protein tái tổ hợp

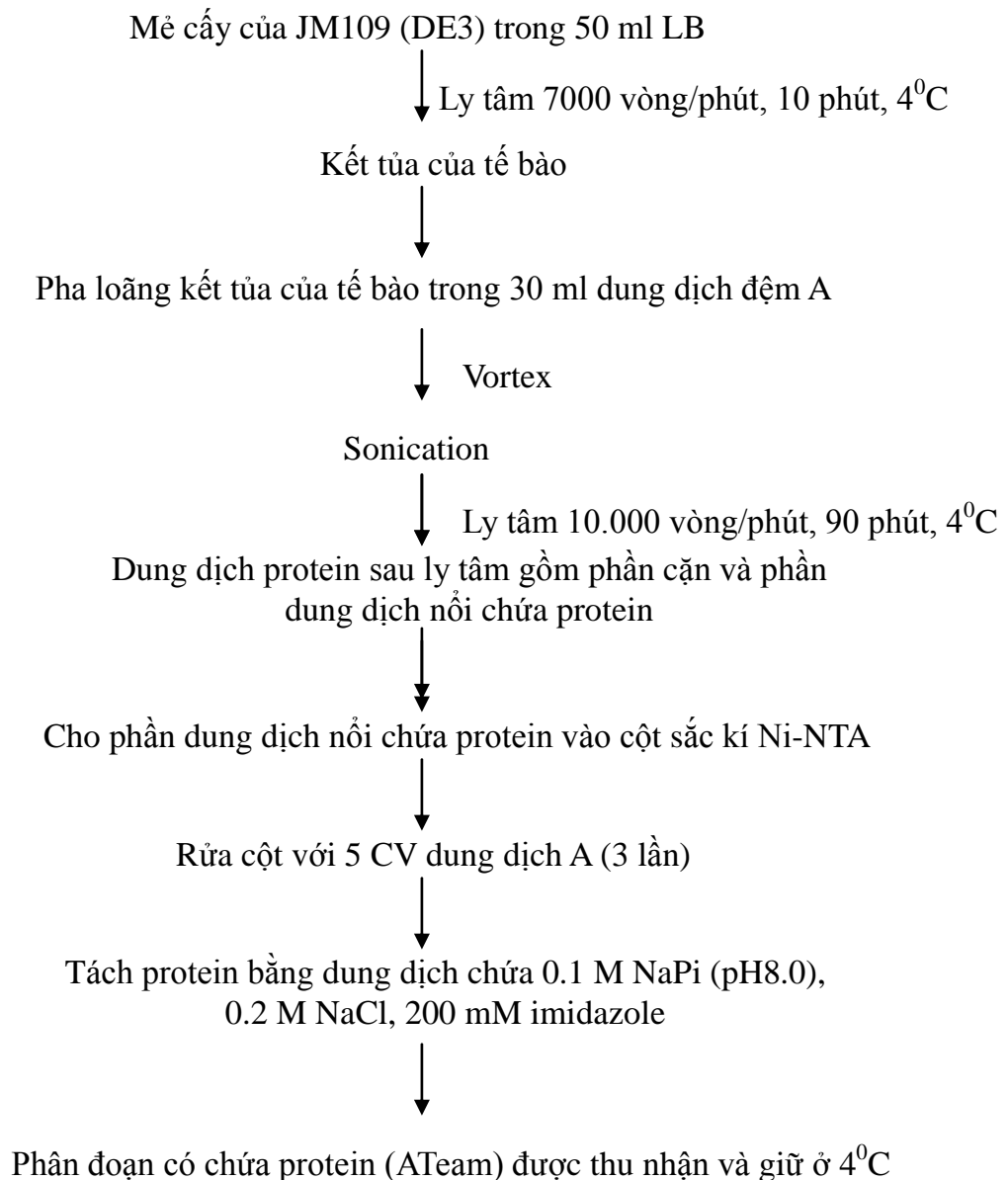
Sau khi được kiểm tra cấu trúc, các plasmid tái tổ hợp được chuyển vào *E.coli* JM109 (DE3) để biểu hiện protein. *E.coli* JM109 (DE3) sau khi chuyển gen được nuôi cấy trên môi trường thạch LB, 0.1 mg/ml Ampicillin, ủ ở 37⁰C, qua đêm (Hình 3.9).

Để thu nhận protein, *E.coli* JM109 (DE3) được nuôi trong 50 ml LB có 0.1mg/ml Ampicillin, ở 37⁰C, lắc khoảng 140 vòng/phút. Khi mẻ cấy đạt OD₆₀₀ khoảng 0.6, 5μl của 100mM isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG) được thêm vào để nồng độ IPTG cuối cùng trong dịch nuôi cấy đạt 10 μM. Tiếp đó, mẻ cấy được ủ ở 24⁰C, lắc khoảng 140 vòng/phút, trong 24 giờ để biểu hiện protein. Protein tái tổ hợp có mang đuôi Histidine được tinh sạch bằng sắc kí cột với Ni-NTA resin theo sơ đồ sau:

* **Chuẩn bị cột sắc kí:**

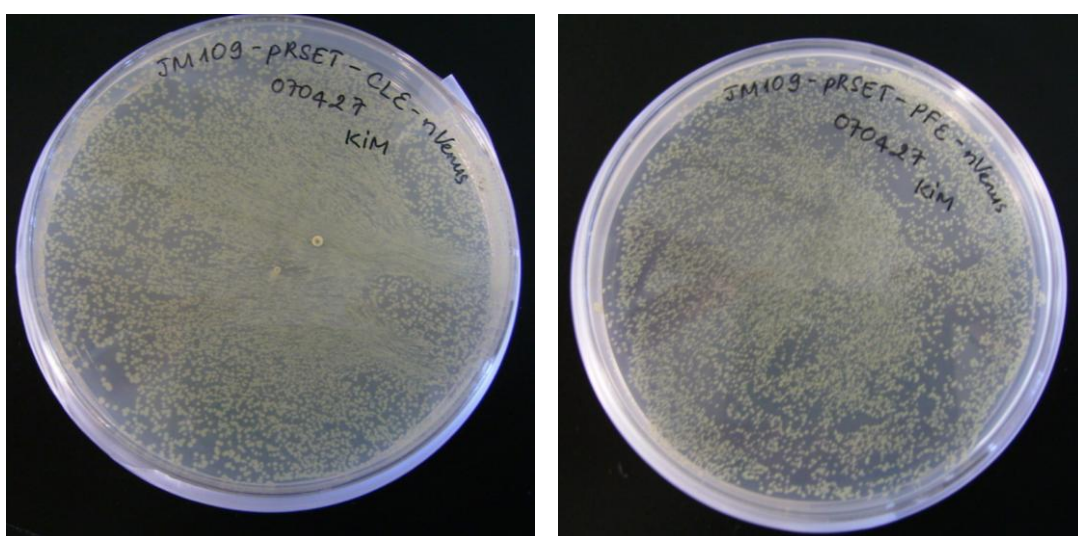


* **Tinh sạch protein:**

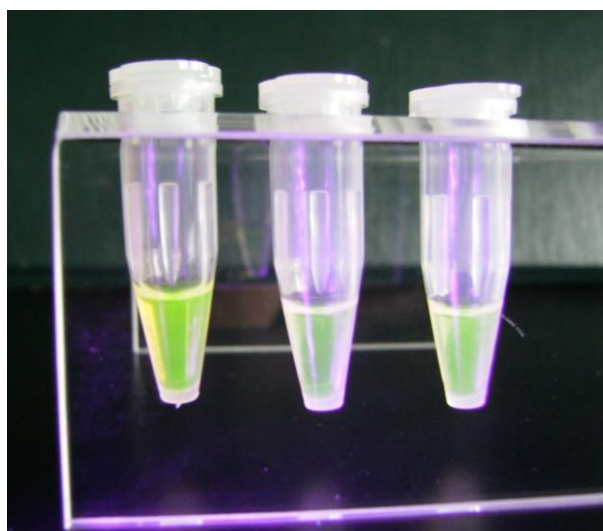


Phân đoạn có chứa ATeam được cô đặc bằng Amicon Ultra Centrifugal Filter devices (30k) (Millipore). Protein thu được sau sắc ký cột Ni-NTA được kiểm tra bằng SDS-PAGE.

Sau đó tiếp tục tinh sạch ATeam bằng sắc ký lọc gel, cột sắc ký Superdex 200 (Amersham Biosciences). Cột sắc ký được cân bằng bởi dung dịch đệm chứa 20mM TrisHCl, 150 mM NaCl. Trong suốt quá trình sắc ký lọc gel, sự hấp thụ ánh sáng ở các bước sóng 280 nm, 435 nm và 515 nm được theo dõi để xác định lần lượt protein, CFP và Venus.



Hình 3.9: Nuôi cấy *E.coli* JM 109 (DE3) trên môi trường thạch LB, 0.1 mg/ml Ampicillin.



Hình 3.10: Protein ATeam sau khi tinh sạch bằng sắc ký lọc gel.

(Từ trái sang: ATeam BME - nVenus, ATeam BCL - nVenus, ATeam BPF - nVenus)

3.3.4. Đánh giá các ATeam *in vitro*

3.3.4.1. Đo quang phổ huỳnh quang của ATeam

Quang phổ huỳnh quang của các ATeam EF1ε-nVenus và ATeam EF1ε-cpVenus được đo bằng cách pha loãng protein trong dung dịch đệm chứa 50 mM MOPS-KOH (pH7.5), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA, ở 37⁰C, sử dụng Spectrofluorometer FP-6500 (Jasco, Nhật Bản). ATP-Na (231 mM) được thêm vào để tạo các nồng độ ATP khác nhau. CFP được kích thích bởi ánh sáng có bước sóng 435 nm, ánh sáng huỳnh quang phát ra được đo trong khoảng từ 460 nm đến 600 nm.

Quang phổ huỳnh quang của các ATeam khác được đo bằng cách pha loãng protein trong dung dịch đệm chứa 50 mM MOPS-KOH (pH7.5), 50 mM KCl, 1 mg/ml BSA, ở 37⁰C, sử dụng Spectrofluorometer FP-6500 (Jasco, Nhật Bản). MgATP (200 mM) được thêm vào để tạo các nồng độ MgATP khác nhau. CFP được kích thích bởi ánh sáng có bước sóng 435 nm, ánh sáng huỳnh quang phát ra được đo trong khoảng từ 460 nm đến 600 nm.

Lưu ý rằng đã có sự thay đổi từ 2 mM MgCl₂ cố định và ATP-Na tự do ở các nồng độ khác nhau trong các thí nghiệm trước với ATeam EF1ε-nVenus và ATeam EF1ε-cpVenus sang MgATP. Nguyên nhân là do trong tế bào, các nucleoside triphosphate được cho là hiện diện dưới dạng phức hợp NTP-Mg²⁺ và sự kết hợp của ion Mg²⁺ giúp cho sự tương tác giữa phức hợp ATP-Mg²⁺ và các enzyme phụ thuộc ATP, do đó, làm tăng khả năng gắn kết (theo J. M. Berg và ctv., *Biochemistry*, 6th edition).

3.3.4.2. Đo time-course của ATeam

Trong báo cáo này, time-course được đo dựa vào sự giảm cường độ huỳnh

quang của CFP ở các nồng độ MgATP khác nhau. Đo time-course bằng cách khuấy liên tục hỗn hợp ATeam và MgATP ở các nồng độ khác nhau trong dung dịch đệm gồm 50 mM MOPS-KOH (pH 7.5), 50 mM KCl, 0.05% Triton X100, ở 37⁰C, sử dụng Spectrofluorometer FP-6500 (Jasco, Nhật Bản). CFP được kích thích bởi ánh sáng có bước sóng 435 nm, time-course được đo trong 200 giây, tín hiệu huỳnh quang từ CFP được ghi nhận ở mỗi giây.

3.3.4.3. Công thức tính dynamic range

Dynamic range là sự thay đổi tỉ lệ cường độ huỳnh quang YFP/CFP giữa nồng độ ATP bằng không (0) và nồng độ ATP bão hoà.

(Lưu ý, trong trường hợp của ATeam EF1ε-nVenus và ATeam EF1ε-cpVenus, dynamic range được tính theo tỉ lệ của CFP/YFP).

$$\text{Dynamic range (\%)} = [(R_{\max} - R_{\min}) / R_{\min}] * 100\% \quad (3.1)$$

Trong đó:

- R_{\min} là tỉ lệ huỳnh quang nhỏ nhất của YFP/CFP (khi không có mặt ATP).
- R_{\max} là tỉ lệ huỳnh quang cao nhất của YFP/CFP (khi ATP bão hoà).

3.3.4.4. Công thức tính hằng số phân ly

Hằng số phân ly giữa ATP và ATeam được tính bằng phần mềm KaleidaGraph v3.51 bằng cách vẽ đồ thị tỉ lệ huỳnh quang của YFP/CFP theo nồng độ MgATP dựa vào phương trình sau:

$$R = (R_{\max} - R_{\min}) / (1 + K' d / [MgATP]^n) + R_{\min} \quad (3.2)$$

Trong đó:

- R_{\min} là tỉ lệ huỳnh quang nhỏ nhất của YFP /CFP (khi không có mặt ATP).
- R_{\max} là tỉ lệ huỳnh quang cao nhất của YFP/CFP. (khi ATP bão hoà)
- R là tỉ lệ huỳnh quang của YFP/CFP ở một nồng độ MgATP nhất định.
- n là Hill coefficient, chỉ số lượng nhỏ nhất của các vị trí gắn cơ chất có

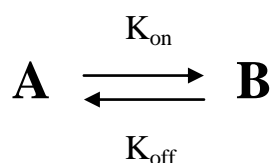
hiệu quả (effective substrate binding-site) trong các protein có nhiều vị trí gắn của cơ chất (multisite protein) hoặc các cooperative protein.

– $K'd$ là hằng số phân ly, có đơn vị là (nồng độ)ⁿ.

3.3.4.5. Công thức tính tốc độ đáp ứng với ATP của ATeam

Gọi: - A là dạng duỗi thẳng của ϵ .

- B là dạng co lại của ϵ (khi kết hợp với ATP)



Tốc độ đáp ứng của ATeam với ATP được tính bằng phần mềm KaleidaGraph v3.51 dựa trên các số liệu về time-course của CFP, bằng cách vẽ đồ thị sự giảm cường độ huỳnh quang của CFP dựa trên phương trình sau:

$$[A] = C_1 * \exp[-(K'_{\text{on}} + K_{\text{off}}) * t] + C_2 \quad (3.3)$$

Trong đó:

– C_1, C_2 là hằng số.

– $K'_{\text{on}} = K_{\text{on}} * [\text{ATP}]$

Với K_{on} là hằng số chỉ tốc độ kết hợp với ATP ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)

– K_{off} : hằng số chỉ tốc độ phân ly với ATP (s^{-1})

Gọi $K' = K'_{\text{on}} + K_{\text{off}}$ là tốc độ đáp ứng của ϵ với ATP

– t là thời gian (s)

Chương 4

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

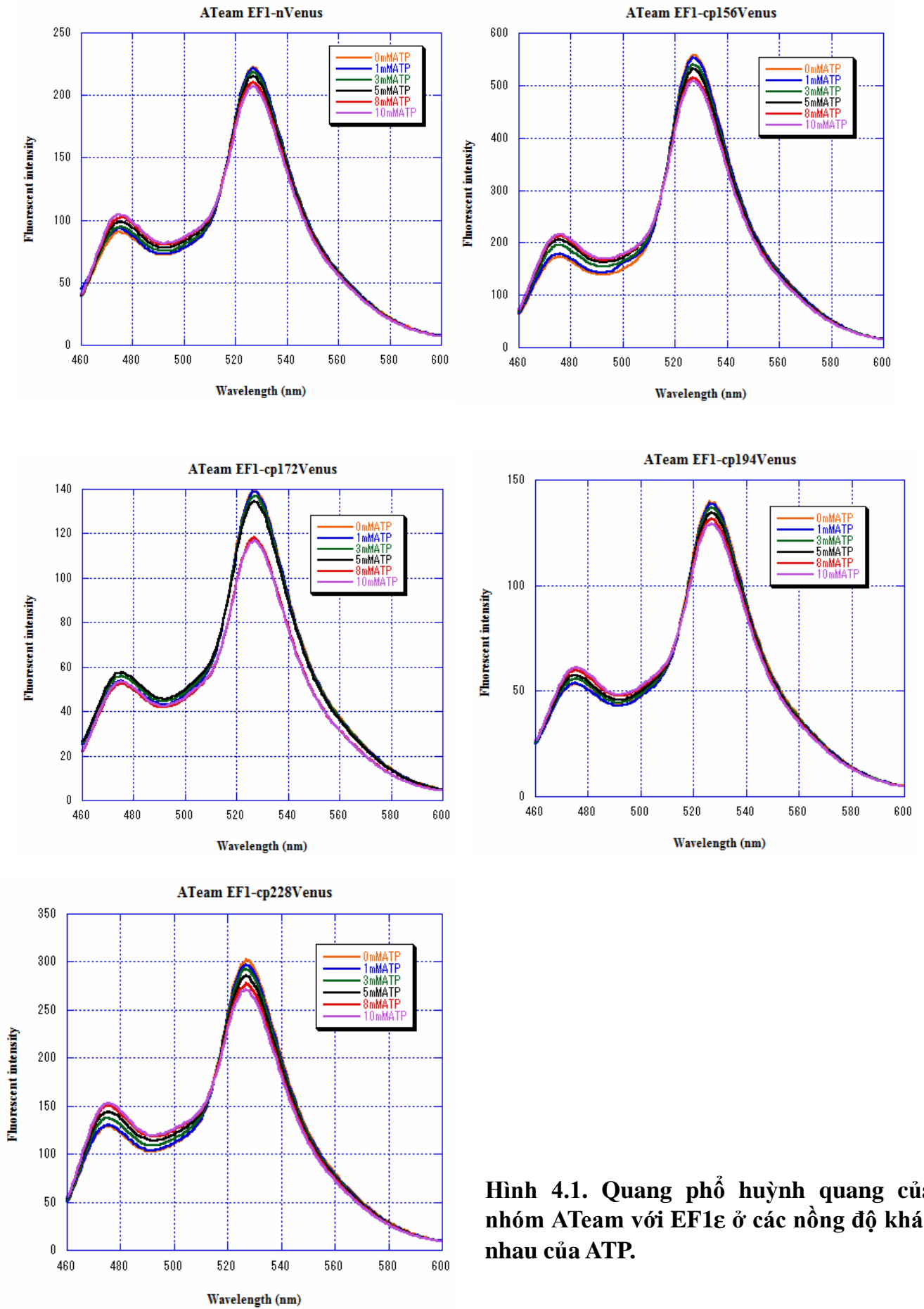
4.1. Kết quả thí nghiệm

4.1.1. Nhóm ATeam EF1 ϵ -nVenus và ATeam EF1 ϵ -cpVenus

Tôi đã tiến hành đo quang phổ huỳnh quang của 5 loại ATeam sau: EF1 ϵ -nVenus, EF1 ϵ -cp156Venus, EF1 ϵ -cp172Venus, EF1 ϵ -cp194Venus, EF1 ϵ -cp228Venus. ATeam EF1 ϵ -cp49Venus đã không được biểu hiện khi nuôi cấy *E.coli* trong dung dịch LB mà không rõ nguyên nhân. Kết quả đo quang phổ huỳnh quang được trình bày trong hình 4.1. Theo đó, EF1 ϵ có ái lực với ATP ở mức millimole nhưng sự thay đổi của tín hiệu FRET khi tăng nồng độ ATP là rất thấp. Hơn nữa, khi tăng nồng độ ATP thì có sự tăng cường độ huỳnh quang của CFP và giảm cường độ huỳnh quang của Venus. Dynamic range của các ATeam này được tính theo công thức (3.1) dựa vào tỉ lệ huỳnh quang của CFP/YFP, kết quả được trình bày ở bảng 4.1.

Bảng 4.1: Bảng so sánh dynamic range của nhóm ATeam EF1 ϵ -nVenus và EF1 ϵ -cpVenus

ATeam	R _{min} (CFP/YFP)	R _{max} (CFP/YFP)	Dynamic range (%)
EF1-nVenus	0.42266	0.5454812	29.1
EF1-cp156	0.4086884	0.505226	23.6
EF1-cp172	0.311661	0.4249352	36.3
EF1-cp194	0.381362	0.4721793	24
EF1-cp228	0.4263976	0.562477	32



Hình 4.1. Quang phổ huỳnh quang của nhóm ATeam với EF1ε ở các nồng độ khác nhau của ATP.

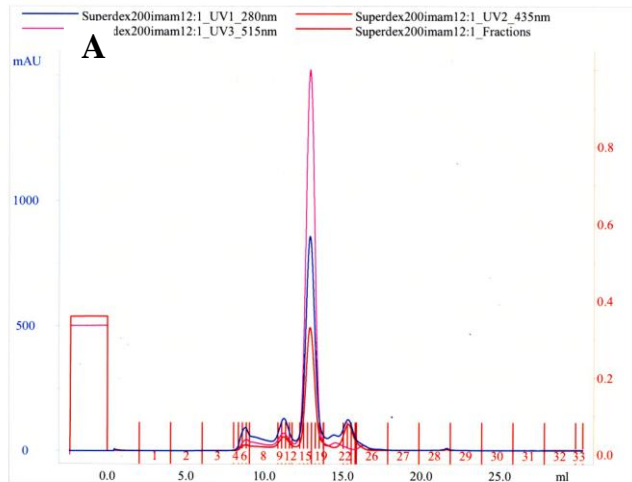
4.1.2. Kết quả sắc ký lọc gel của ATeam BME-nVenus, BCL-nVenus, BPF-nVenus

Khi tinh sạch các ATeam BME-nVenus, BCL-nVenus, BPF-nVenus bằng sắc ký lọc gel, kết quả cho thấy ATeam BME-nVenus chỉ có một đỉnh (peak) hấp thụ cùng lúc ánh sáng ở ba bước sóng 280 nm, 435 nm và 515 nm chứng tỏ các phân đoạn của đỉnh này chứa protein ATeam BME-nVenus cần thu nhận (Hình 4.2A). Nhưng kết quả của ATeam BCL-nVenus, BPF-nVenus lại có 2 đỉnh cùng hấp thụ ánh sáng ở các bước sóng trên, điều này có nghĩa là cả hai đỉnh cùng chứa ATeam nhưng ATeam ở đỉnh thứ nhất có kích thước phân tử lớn hơn hay đó là các protein bị kết dính (aggregate protein), ở dạng đa phân tử (Hình 4.2B,C). Để khẳng định lại điều này, tôi thực hiện Native-PAGE với protein thu được từ đỉnh thứ nhất và thứ hai của ATeam BCL-nVenus, BPF-nVenus. Kết quả Native-PAGE được kiểm tra bằng ánh sáng có bước sóng 415 nm, các băng chứa ATeam sẽ phát huỳnh quang dưới ánh sáng này (Hình 4.3).

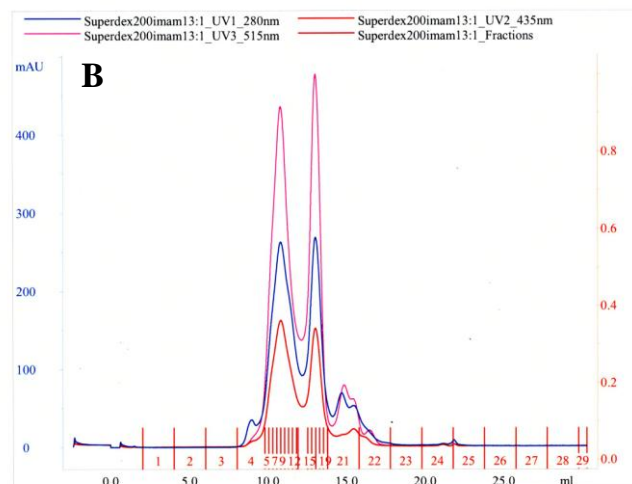
Kết quả cho thấy protein BCL-nVenus (2) có 2 băng phát huỳnh quang, trong đó, băng thứ nhất phát quang rất yếu, băng này nằm cùng vị trí với băng đầu tiên của BCL-nVenus (1), protein trong băng này có kích thước phân tử lớn hơn protein trong băng thứ hai. Do đó, protein trong băng thứ nhất của BCL-nVenus (2) là ở dạng đa phân tử, còn protein trong băng thứ hai ở dạng đơn phân tử. BCL-nVenus (1) hình thành 3 băng phát huỳnh quang, trong đó, protein trong băng thứ nhất và thứ hai có kích thước phân tử gần bằng nhau, tương ứng với dạng đa phân tử, protein ở băng thứ ba ở dạng đơn phân. Tương tự, BPF-nVenus (2) gồm 2 băng tương ứng với dạng đa và đơn phân tử, BPF-nVenus (1) gồm 2 băng, chỉ có dạng đa phân tử.

Kết quả của Native-PAGE đề nghị rằng ATeam có thể có khả năng chuyển từ dạng đơn phân sang dạng tập hợp và ngược lại. Để kiểm tra tính chất này, BCL-nVenus (1) và BCL-nVenus (2) được thực hiện sắc ký lọc gel một lần nữa. Như kết quả ở hình 4.4, phần lớn BCL-nVenus (2) vẫn ở dạng đơn phân trong khi một phần BCL-nVenus (1) đã chuyển sang dạng đơn phân. Những kết quả này cho thấy dạng

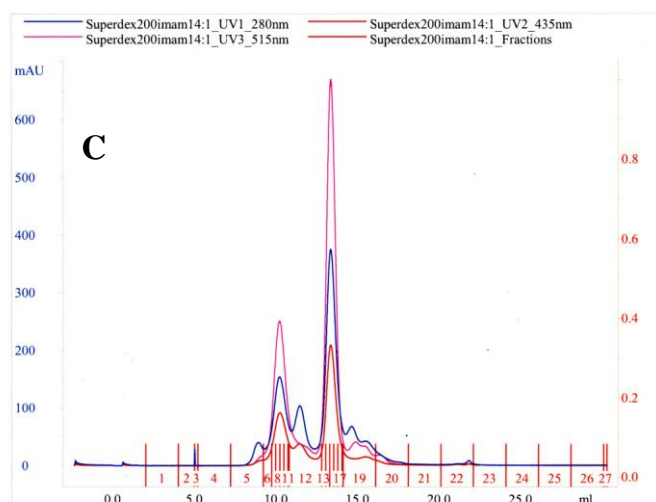
đơn phân và dạng kết hợp của ATeam BCL-nVenus là ở trạng thái cân bằng.



A. ATeam BME-nVenus

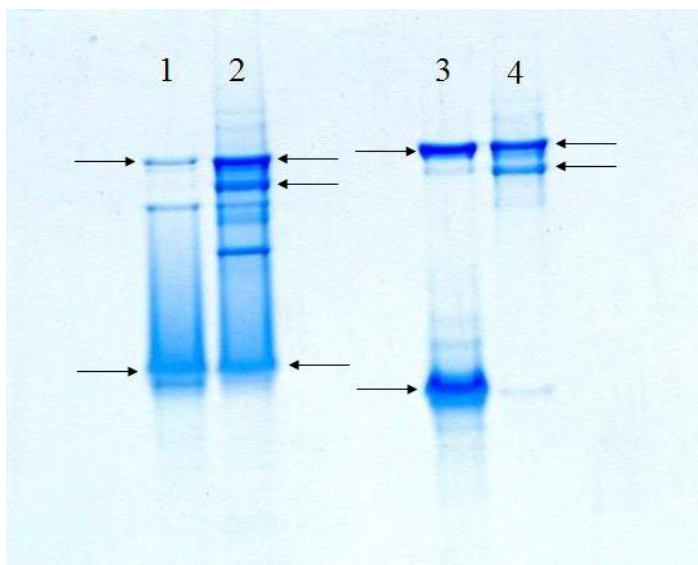


B. ATeam BCL-nVenus



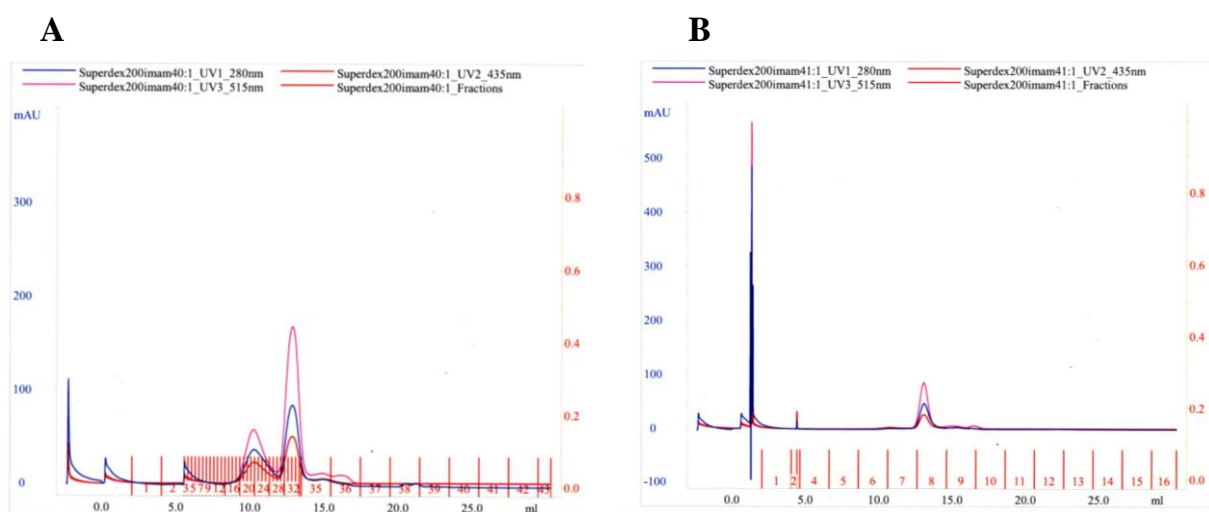
C. ATeam BPF-nVenus

Hình 4.2. So sánh kết quả sắc ký lọc gel của ATeam BME-nVenus, ATeam BCL-nVeuns, ATeam BPF-nVenus.



1. BCL-nVenus (2)
2. BCL-nVenus (1)
3. BPF-nVenus (2)
4. BPF-nVenus (1)

Hình 4.3. Kết quả Native-PAGE của ATeam BCL-nVenus và ATeam BPF-nVenus.
(mũi tên chỉ các băng phát huỳnh quang dưới ánh sáng 415 nm)



Hình 4.4. Kết quả sắc ký lọc gel của BCL-nVenus (1) và BCL-nVenus (2).

A. BCL-nVenus (1)

B. BCL-nVenus (2)

Từ các kết quả của sắc ký lọc gel và Native-PAGE, ATeam BCL-nVenus (2) và BPF-nVenus (2) - ATeam ở dạng đơn phân - sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm đánh giá *in vitro*.

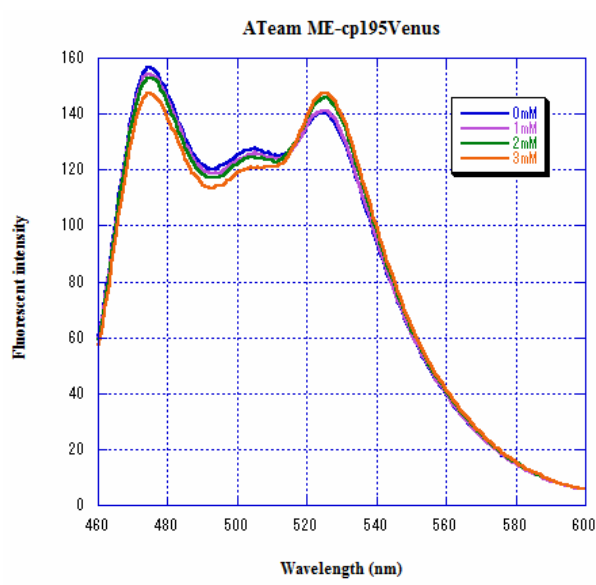
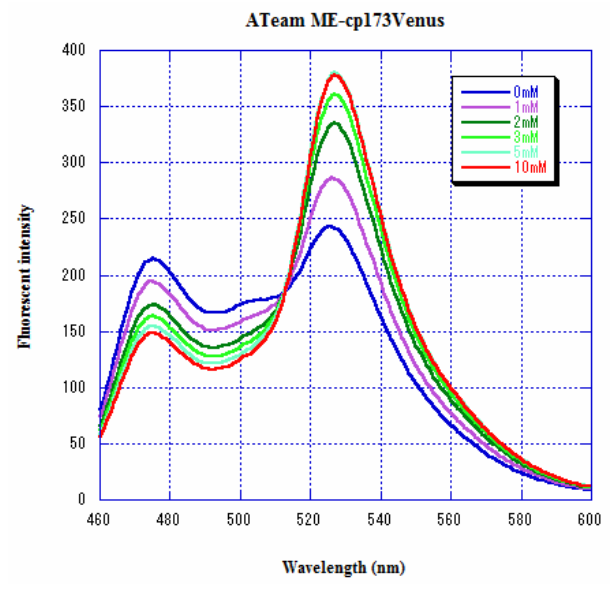
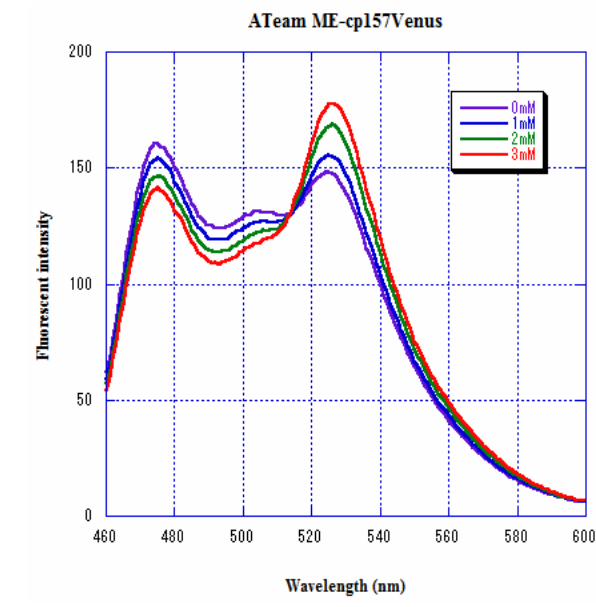
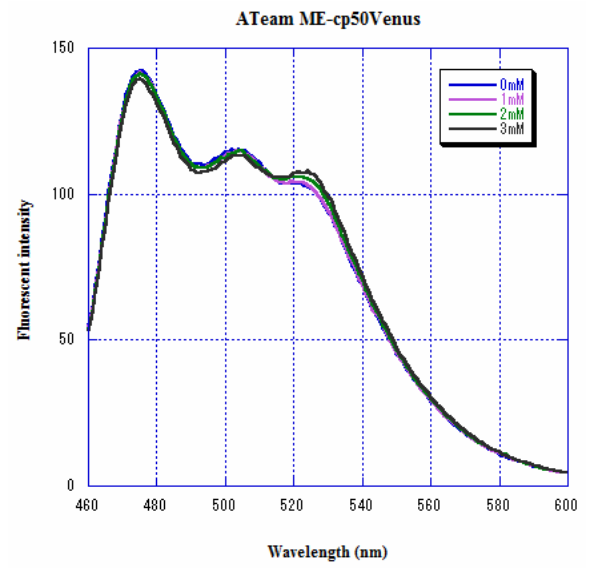
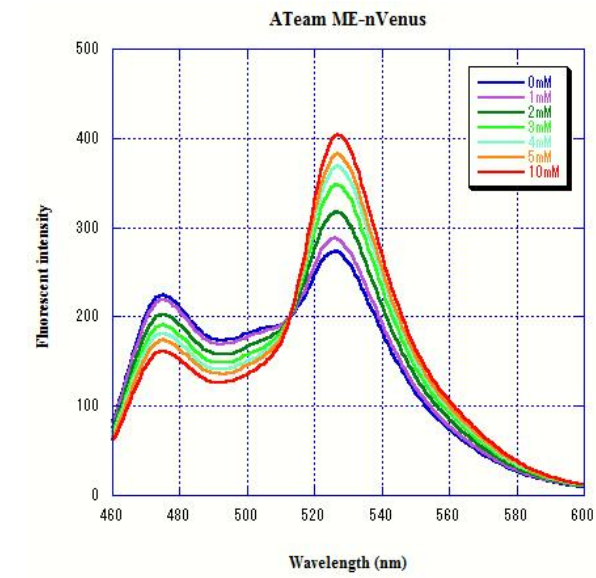
4.1.3. Nhóm ATeam BME-nVenus và ATeam BME-cpVenus

Kết quả thí nghiệm *in vitro* cho thấy các ATeam thuộc nhóm này có ái lực với MgATP ở mức millimole. Trong đó, ATeam BME-cp173Venus có sự thay đổi về tín hiệu FRET lớn nhất khi tăng nồng độ MgATP. Trong khi đó, ATeam BME-cp50Venus và ATeam BME-cp195Venus chỉ có những đáp ứng rất nhỏ với MgATP. ATeam BME-nVenus và ATeam BME-cp157Venus cũng có sự thay đổi FRET đáng kể nhưng dynamic range thấp hơn so với ATeam BME-cp173Venus (Hình 4.5 và Bảng 4.2).

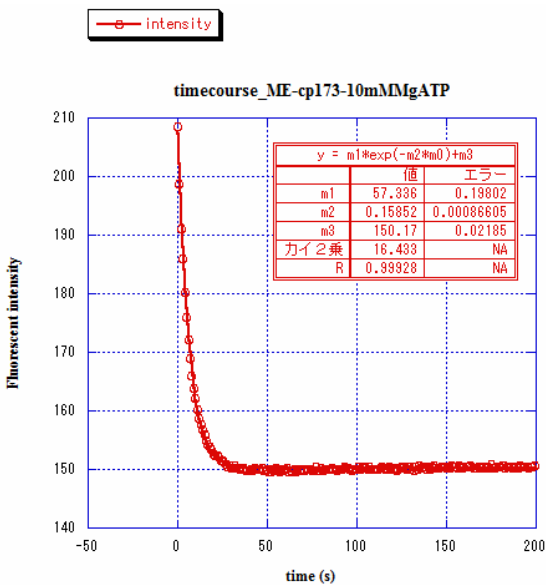
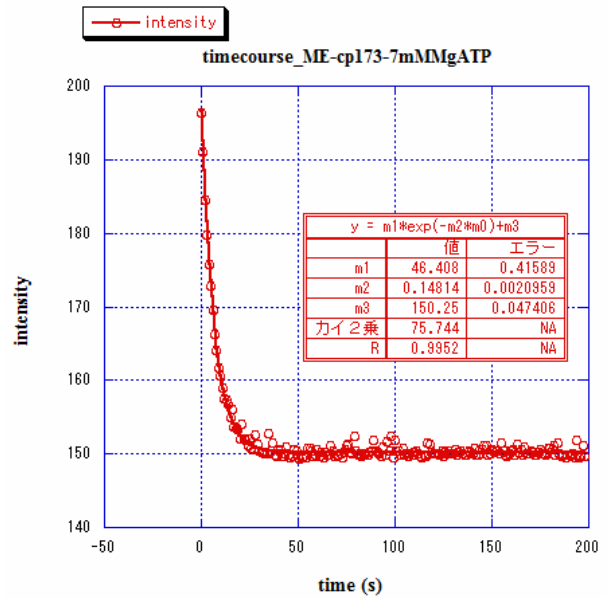
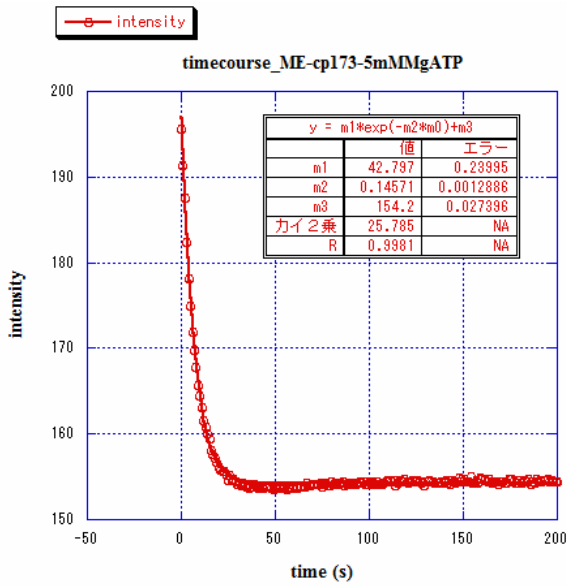
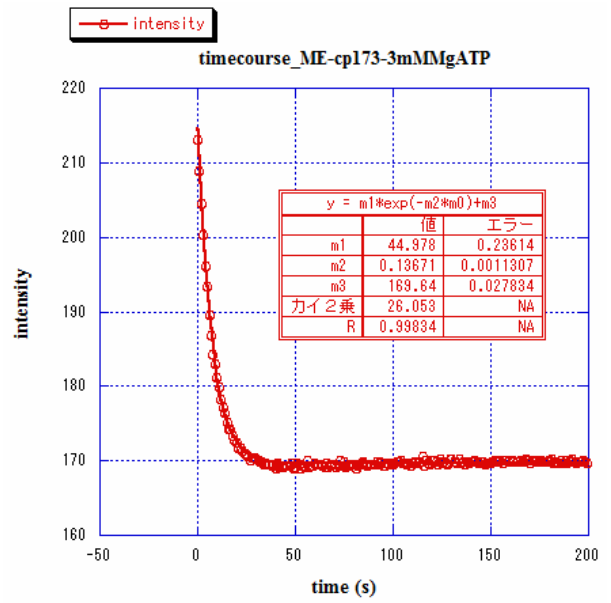
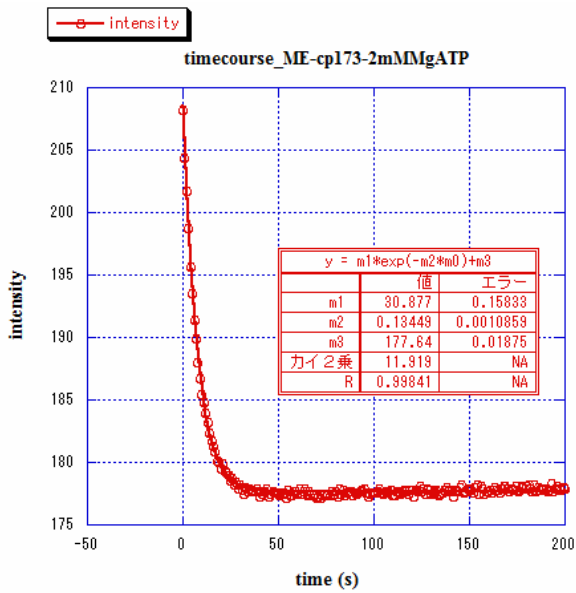
Các thông số động lực học của ATeam ME-cp173Venus, như: tốc độ đáp ứng của ATeam này với MgATP ở các nồng độ khác nhau được tính dựa vào công thức 3.3 và các số liệu về time-course, trình bày ở hình 4.6; hằng số phân ly với ATP ($K'd$) và Hill coefficient (n) tính theo công thức 3.2 và tỉ lệ huỳnh quang của YFP/CFP, được trình bày trong hình 4.7.

Bảng 4.2: Bảng so sánh dynamic range của nhóm ATeam BME-nVenus và BME-cpVenus

ATeam	R_{\min} (YFP/CFP)	R_{\max} (YFP/CFP)	Dynamic range (%)
ME-nVenus	1.22	2.51	105.74
ME-cp50Venus	0.7	0.82	17.14
ME-cp157Venus	0.92	1.6	74
ME-cp173Venus	1.12	2.55	127.68
ME-cp195Venus	0.89	1.22	37



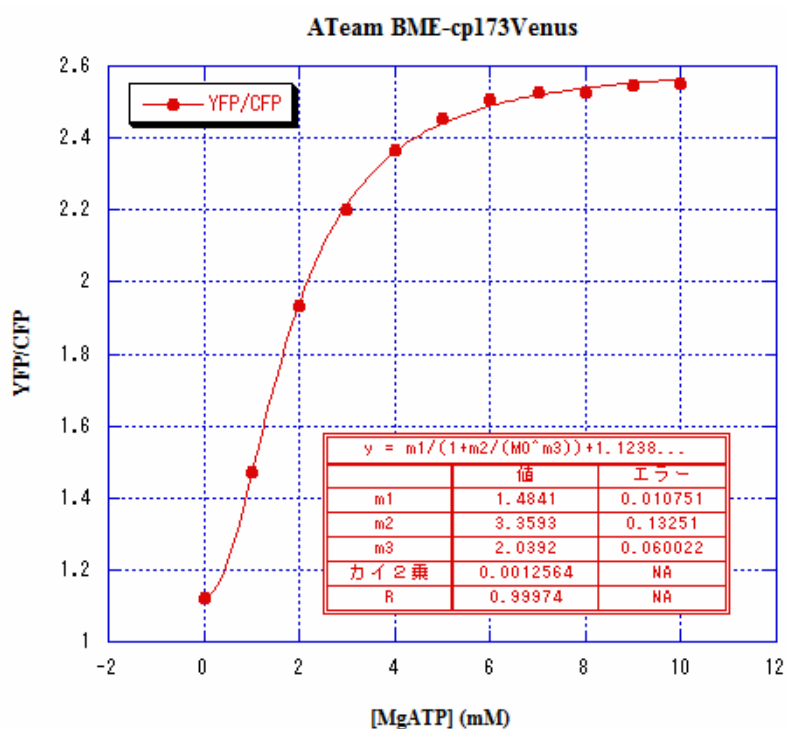
Hình 4.5. Quang phổ huỳnh quang của nhóm ATeam với BMEε ở những nồng độ khác nhau của MgATP.



Hình 4.6. Kết quả đo time-course của ATeam BME-cp173Venus ở các nồng độ xác định của MgATP.

Từ kết quả đo timecourse của ATeam BME-cp173Venus, tốc độ đáp ứng của ATeam này ở các nồng độ MgATP lần lượt là:

- 2 mM MgATP: $K' = 0.134$
- 3 mM MgATP: $K' = 0.137$
- 5 mM MgATP: $K' = 0.146$
- 7 mM MgATP: $K' = 0.148$
- 10 mM MgATP: $K' = 0.159$

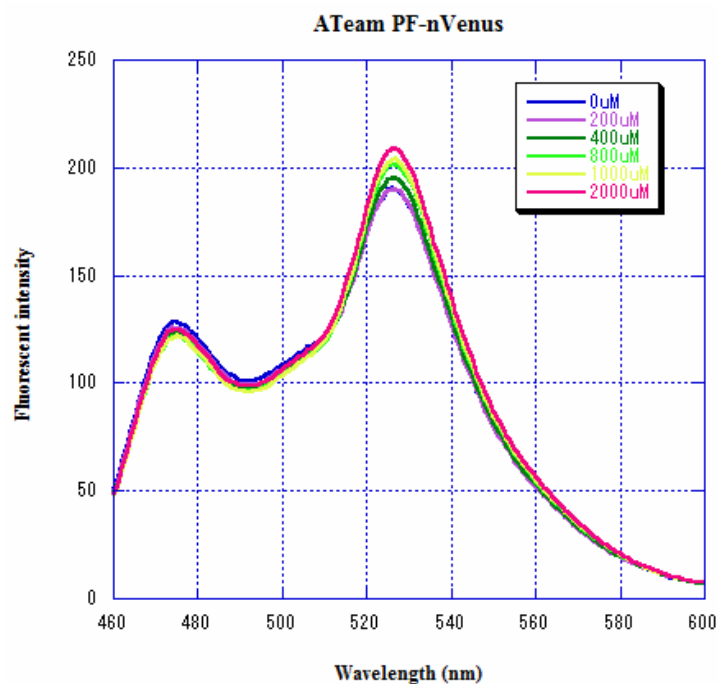


Hình 4.7. Đường cong chuẩn độ với MgATP của ATeam BME-cp173Venus.

Hằng số phân ly ($K'd$) 3.36, Hill coefficient 2.04

4.1.5. ATeam BPF-nVenus:

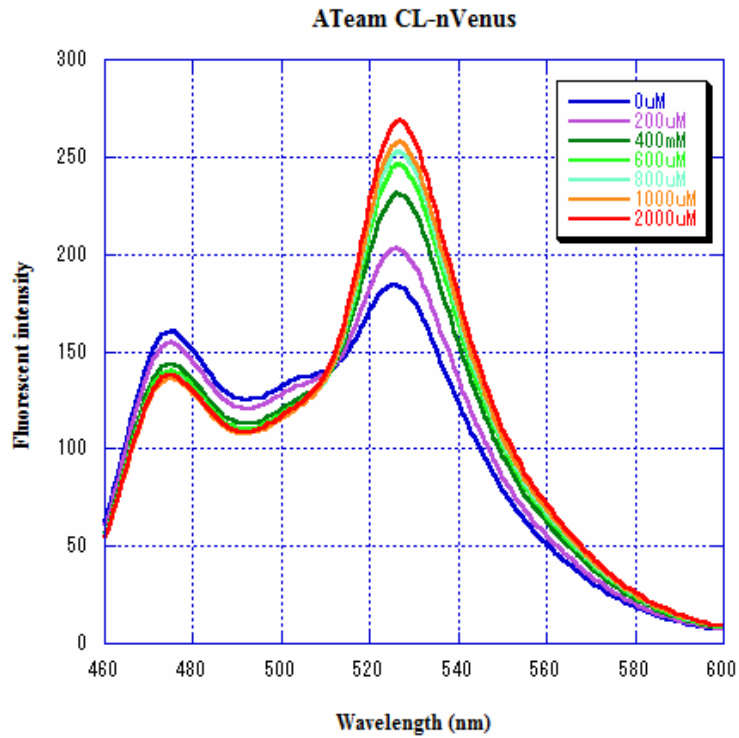
BPFε có ái lực với MgATP cao hơn so với BMEε nhưng sự thay đổi tín hiệu FRET giữa các nồng độ MgATP khác nhau của ATeam BPF-nVenus rất thấp. (hình 4.8).



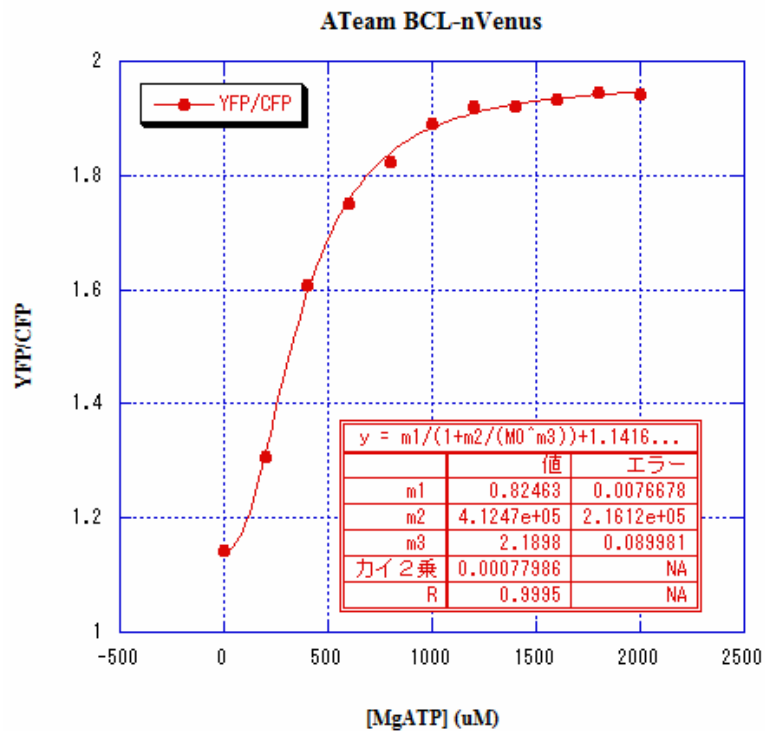
Hình 4.8. Quang phổ huỳnh quang của ATeam BPFε-nVenus.

4.1.6. Nhóm ATeam với BCLε:

Theo kết quả đo quang phổ huỳnh quang của ATeam BCL-nVenus, ATeam này có ái lực với MgATP cao hơn so với ATeam của BMEε, tương tự như BPFε, nhưng sự đáp ứng của ATeam BCL-nVenus đối với các nồng độ khác nhau của MgATP gây ra sự thay đổi rất đáng kể hiệu ứng FRET, đặc biệt ở các nồng độ từ 200 μM đến 1000 μM MgATP (Hình 4.9). Đồ thị về tỉ lệ giữa YFP/CFP theo các nồng độ khác nhau của MgATP cho thấy, ATeam này có ái lực với MgATP trong khoảng từ 0 μM đến 1000 μM, bão hoà từ 1000 μM trở lên và sự thay đổi của FRET trong khoảng này đủ lớn để có thể sử dụng cho mục đích xác nồng độ ATP trong tế bào. (Hình 4.10).



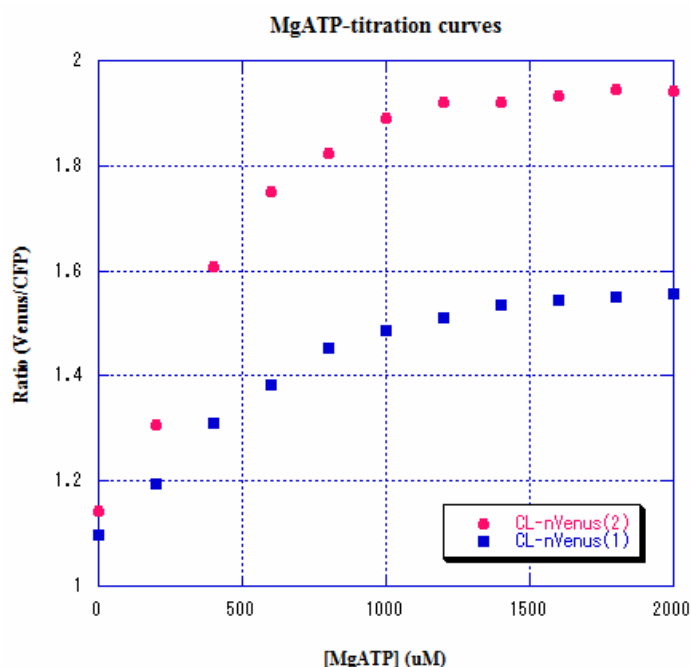
Hình 4.9. Quang phổ huỳnh quang của ATeam BCL-nVenus



Hình 4.10. Đường cong chuẩn độ với MgATP của ATeam CL-nVenus.

Hằng số phân ly $K'd = 4.12 \cdot 10^5$ và Hill coefficient $n = 2.2$

Tuy nhiên, ATeam BCL-nVenus có thể ở dạng đa phân tử. Để kiểm tra khả năng đáp ứng với MgATP của ATeam ở dạng đa phân tử, ATeam thu được trong đỉnh thứ nhất của sắc ký lọc gel (ATeam BCL-nVenus (1)) được sử dụng để đo quang phổ huỳnh quang và vẽ đường cong chuẩn độ với MgATP. Kết quả so sánh đường cong chuẩn độ của ATeam BCL-nVenus dạng đơn phân và dạng tập hợp cho thấy ATeam BCL-nVenus (1) có đáp ứng với MgATP thấp hơn so với ATeam BCL-nVenus (2) (Hình 4.11). Điều này có thể lý giải là do các protein ở dạng tập hợp không có khả năng gắn với ATP. Do đó để sử dụng trong tế bào sống, ATeam BCL-nVenus cần phải ở dạng đơn phân.



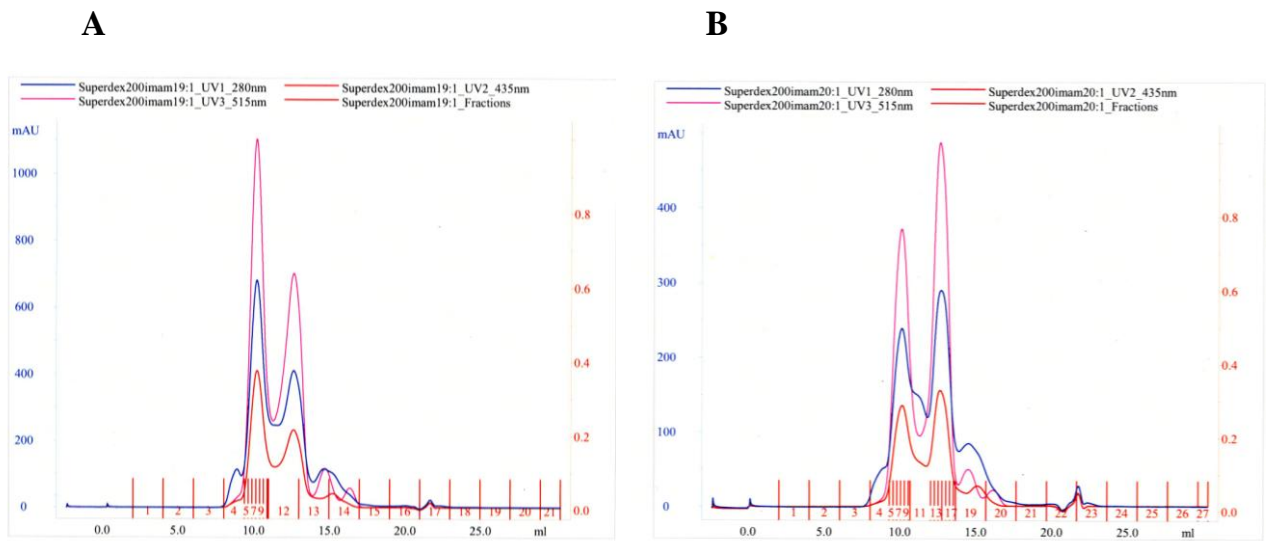
Hình 4.11. So sánh đường cong chuẩn độ với MgATP của ATeam BCL-nVenus (1) và ATeam BCL-nVenus (2).

- Hình vuông màu xanh chỉ ATeam BCL-nVenus (1)
- Hình tròn màu đỏ chỉ ATeam BCL-nVenus (2)

Hiện tượng tập hợp của các protein có khả năng là do nhóm 4 amino acid kỵ nước: Ile9, Val42, Phe67, và Leu78 trên vùng xếp lớp β của tiểu đơn vị BCL ϵ . Nhóm 4 amino acid này có nhiệm vụ gắn với tiểu đơn vị γ trong phức hợp

F1-ATPase/synthase. Có khả năng nhóm amino acid này trong phân tử BCLε đã tương tác với nhau và gây ra hiện tượng kết tụ protein.

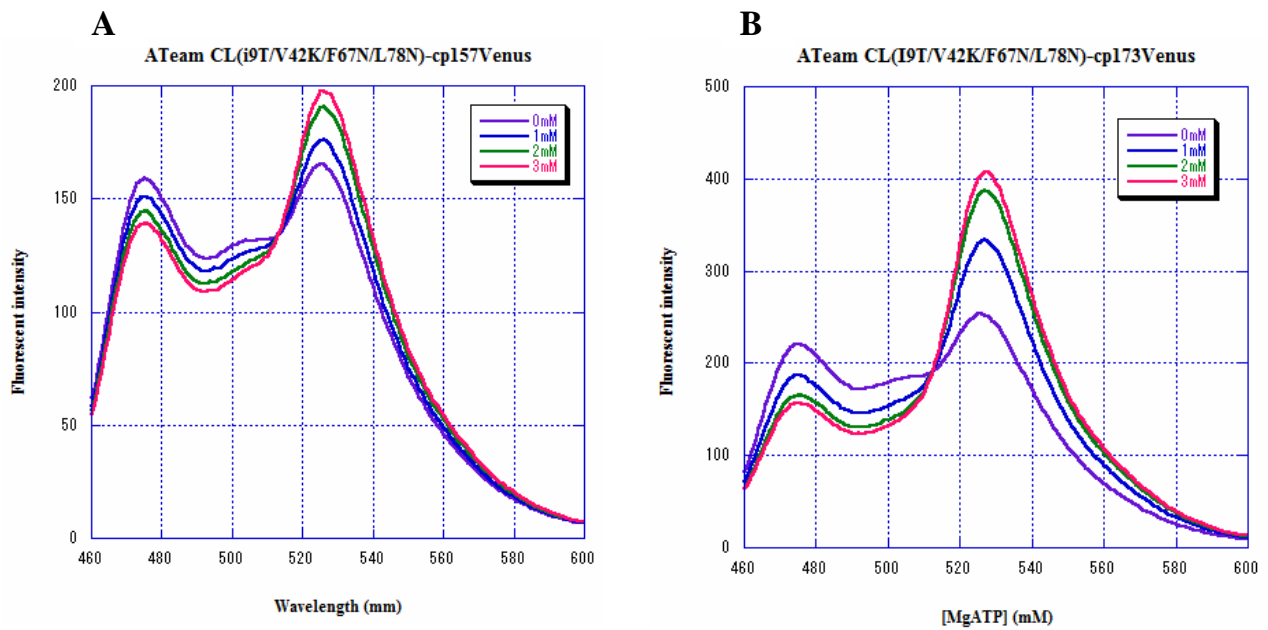
Tôi đã gây đột biến thay thế cả 4 amino acid này bằng các amino acid ưa nước I9T, V42K, F67N và L78N. Đồng thời, ATeam BCL (I9T/V42K/F67N/L78N)-nVenus và các ATeam BCL (I9T/V42K/F67N/L78N)-cpVenus cũng được cấu trúc. Song, chỉ có ATeam BCL (I9T/V42K/F67N/L78N)-cp157Venus và ATeam BCL (I9T/V42K/F67N/L78N)-cp173Venus được biểu hiện thành công trong tế bào E.coli JM109 (DE3). Kết quả kiểm tra hai ATeam này bằng sắc ký lọc gel cho thấy vấn đề về sự kết tụ protein vẫn chưa được giải quyết. (Hình 4.12A,B). Tuy vậy, hai ATeam mới này lại có ái lực với MgATP ở mức millimole. (Hình 4.13A,B).



Hình 4.12. Kết quả sắc ký lọc gel của ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N)-cp157Venus và ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N)-cp173Venus.

A. ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N)-cp157Venus

B. ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N)-cp173Venus



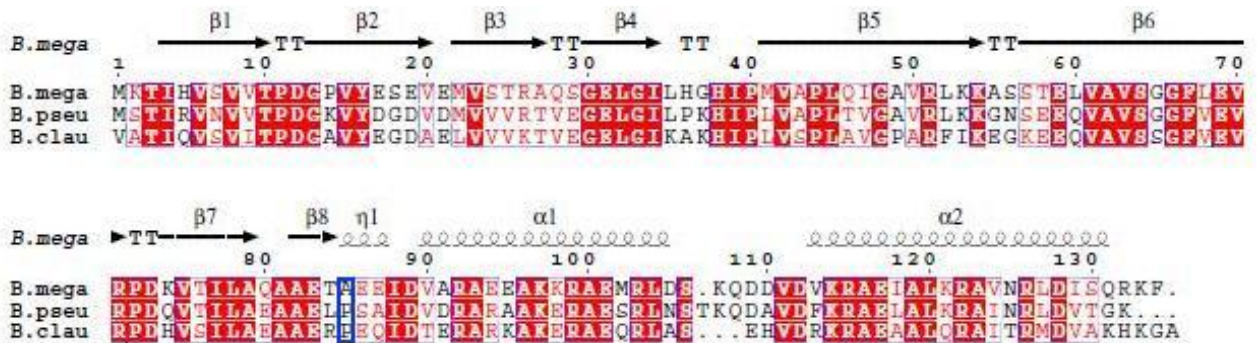
Hình 4.13. Quang phổ huỳnh quang của ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N)-cp157Venus và ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N)-cp173Venus.

A. ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N)-cp157Venus

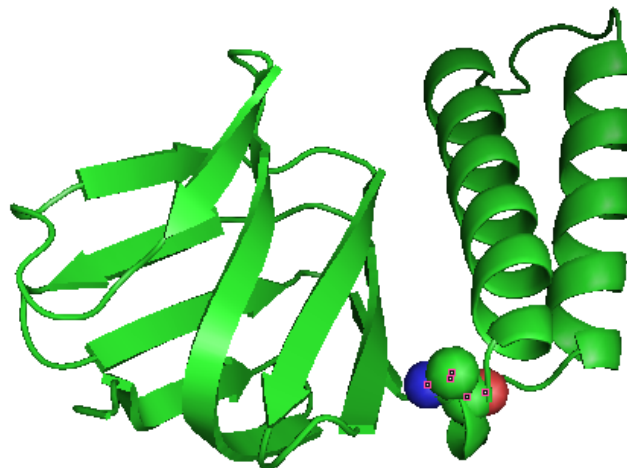
B. ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N)-cp173Venus

Như vậy, nhóm amino acid kỵ nước không phải là nguyên nhân gây ra hiện tượng kết tụ protein. Để tìm hiểu nguyên nhân, tôi tiến hành sắp giống cột trình tự amino acid của BME ϵ , BCL ϵ , BPF ϵ và tìm những phần amino acid có khả năng là nguyên nhân. Việc sắp giống cột được thực hiện bằng phần mềm ClustalW và ESPript 2.2. (Hình 4.13). Theo kết quả sắp giống cột, Pro85 trong phân tử BCL ϵ và BPF ϵ có thể là nguyên nhân gây ra sự kết tụ protein. Proline là một amino acid đặc biệt bởi vì nó có thể hiện diện trong chuỗi polypeptide dưới hai dạng: cis-Proline và trans-Proline. Hơn nữa, Pro85 nằm ở vị trí nối giữa vùng xếp lớp β và vùng xoắn α trong phân tử ϵ (Hình 4.14), do đó, hiện tượng kết tụ protein có thể xảy ra khi Pro ở một trong hai dạng cis-Pro hoặc trans-Pro. Vì những lý do trên, tôi tiến hành tạo đột biến thay thế Pro85 bằng Alanine - amino acid ở vị trí thứ 85 trong phân tử BME ϵ và TF $_1$ - ϵ . Sự thay thế này được thực hiện với cả

BCL ϵ và BCL ϵ (I9T/V42K/F67N/L78N), tạo ra ATeam BCL(P85A)-nVenus và Ateam BCL(I9T /V42K/F67N/L78N/P85A)-nVenus.

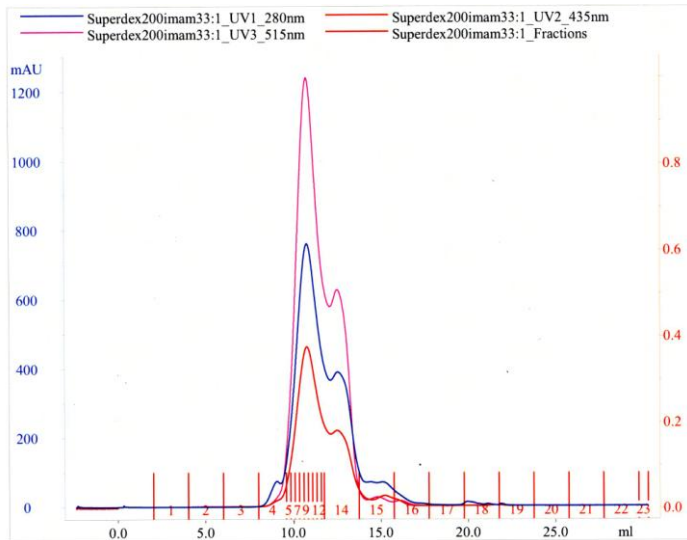


Hình 4.14. Kết quả sắp giống cột của BME ϵ , BPF ϵ và BCL ϵ .
 Vị trí Proline85 được đánh dấu bằng hình chữ nhật màu xanh.

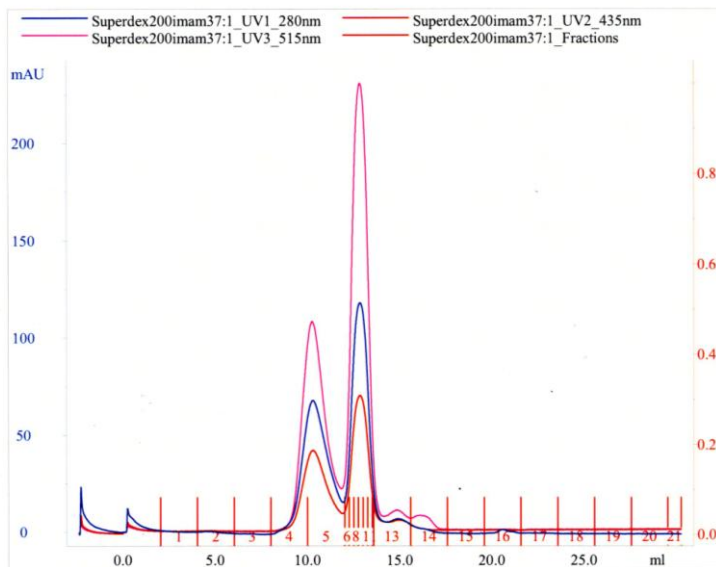


Hình 4.15. Vị trí của Alanine85 trong cấu trúc tinh thể của TF₁- ϵ tương ứng với vị trí của Proline85 trong phân tử BCL ϵ và BPF ϵ . (Yagi và ctv., 2007)

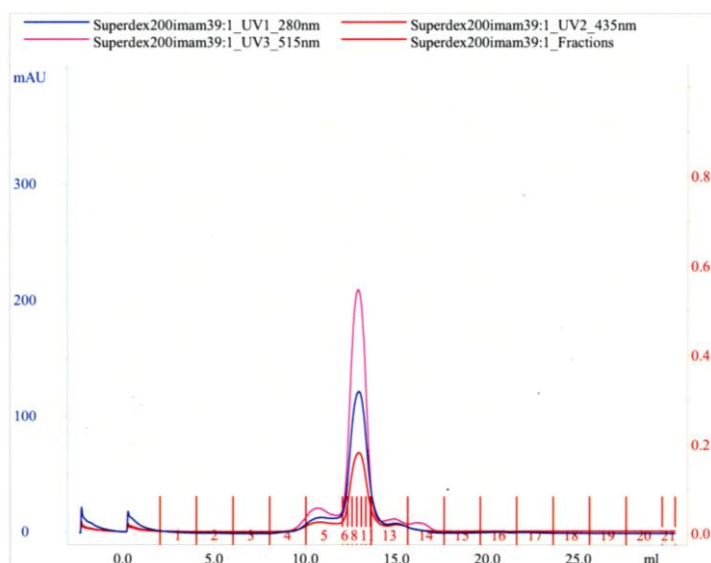
Các ATeam BCL(P85A)-nVenus và ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N/P85A)-nVenus được kiểm tra bằng sắc ký lọc gel và Native-PAGE, kết quả được trình bày trong hình 4.15 và 4.16.



Sắc ký lọc gel của ATeam
BCL(P85A)-nVenus, protein
tách thành hai đỉnh

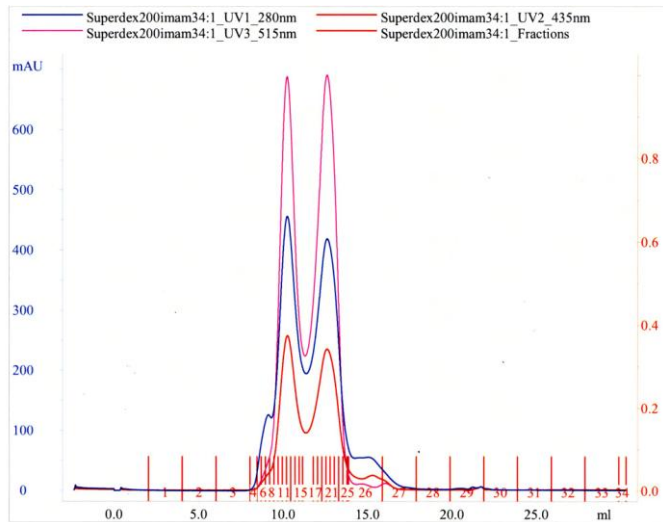


Sắc ký lọc gel của
BCL(P85A)-nVenus (1)

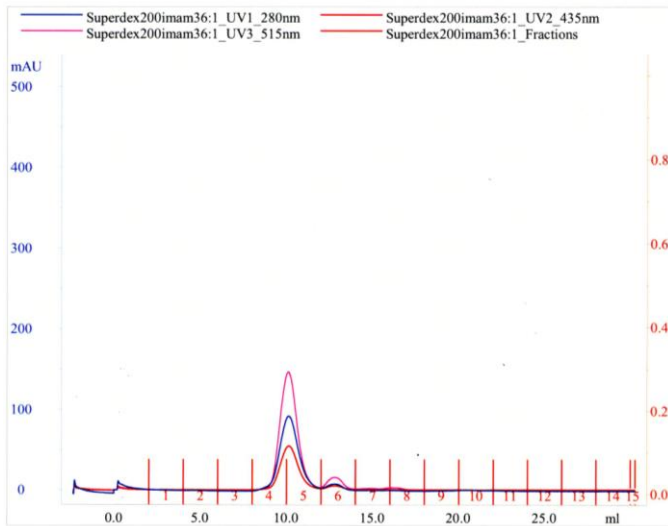


Sắc ký lọc gel của
BCL(P85A)-nVenus (2)

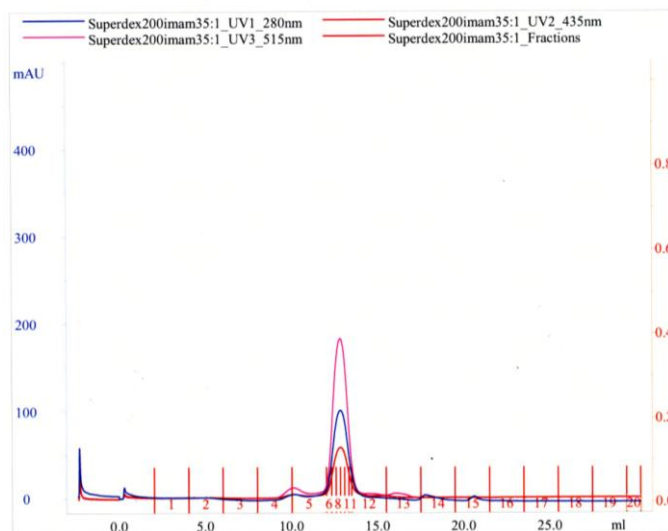
Hình 4.16. Kết quả sắc ký lọc gel của ATeam BCL(P85A)-nVenus



Kết quả sắc ký lọc gel của ATeam
BCL(I9T/V42K/F67N/L78N/P85A)-
nVenus, protein tách thành hai đỉnh.

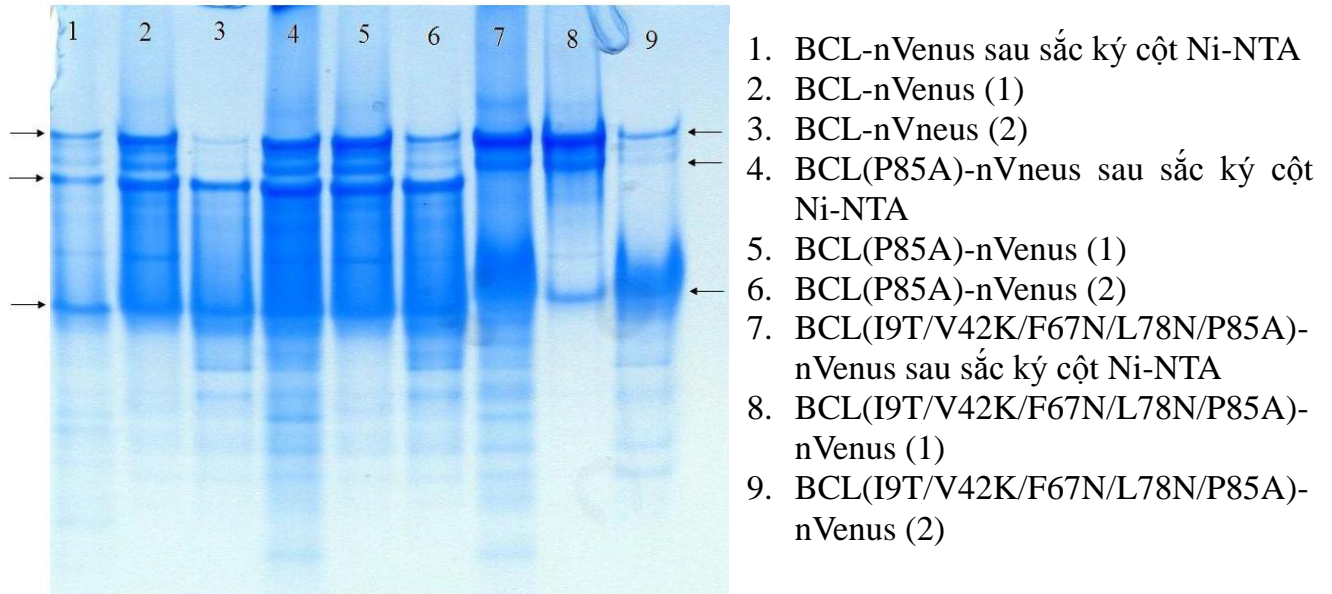


Sắc ký lọc gel của ATeam
BCL(I9T/V42K/F67N/L78N/
P85A)-nVenus (1)



Sắc ký lọc gel của
BCL(I9T/V42K/F67N/L78N/
P85A)-nVenus (2)

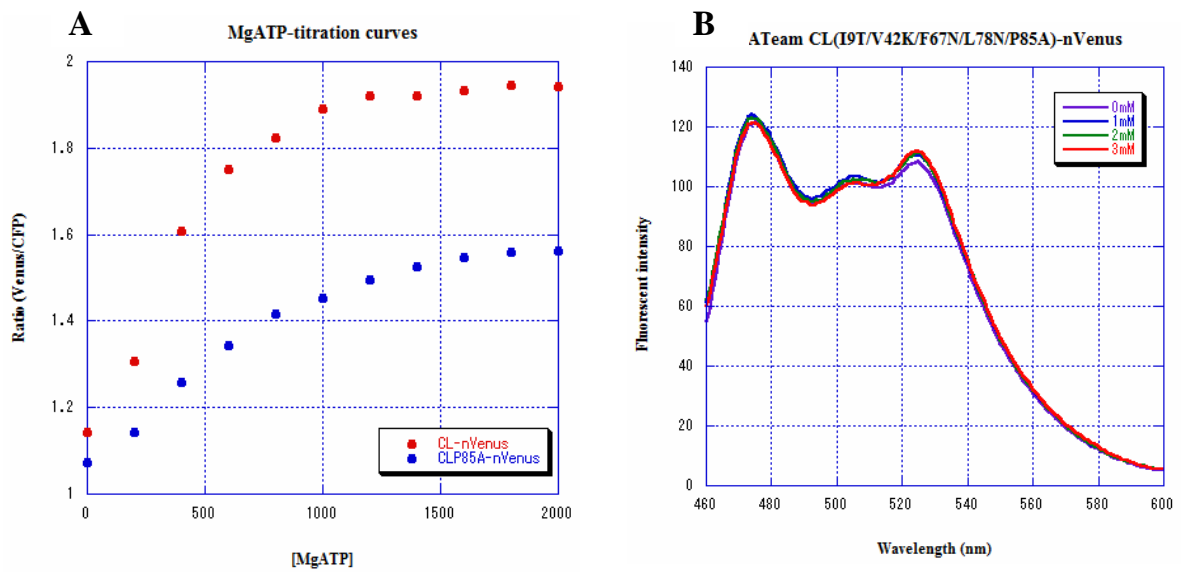
Hình 4.17. Kết quả sắc ký lọc gel của ATeam BCL (I9T/V42K/F67N/L78N/P85A)-nVenus



Hình 4.18. Kết quả Native-PAGE của ATeam BCL-nVenus, ATeam BCL(P85A)-nVenus và ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N/P85A)-nVenus.

(Mũi tên chỉ các băng phát huỳnh quang dưới ánh sáng 415 nm) .

Theo các kết quả trên, đột biến P85A đã không giải quyết được vấn đề protein bị kết tụ (hay đa phân tử). Tuy nhiên, các kết quả này cho thấy ATeam BCL(P85A)-nVenus có khả năng chuyển đổi giữa hai dạng: protein đơn phân và protein đa phân tử trong khi ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N/P85A)-nVenus không có khả năng chuyển đổi. Tôi thử phân tích các tính chất của hai ATeam này sử dụng ATeam BCL(P85A)-nVenus (2) và ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N/P85A)-nVenus (2). Kết quả thu được cho thấy, ATeam BCL(P85A)-nVenus có ái lực với MgATP tương tự như ATeam BCL-nVenus nhưng sự thay đổi của tín hiệu FRET ở các nồng độ khác nhau của MgATP thấp hơn so với ATeam BCL-nVenus. Mặt khác, ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N/P85A)-nVenus hầu như không có ái lực với MgATP ngay cả khi MgATP được thêm vào ở mức millimole. (Hình 4.17).



Hình 4.19. Kết quả đánh giá *in vitro* của ATeam BCL(P85A)-nVenus và ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N/P85A)-nVenus.

- A. So sánh đường cong chuẩn độ của ATeam BCL(P85A)-nVenus và ATeam BCL-nVenus (hình tròn đỏ chỉ ATeam BCL-nVenus, hình tròn xanh chỉ ATeam BCL(P85A)-nVenus)
- B. Quang phổ huỳnh quang của ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N/P85A)-nVenus

4.2. Thảo luận

Nhóm ATeam EF1-nVenus và ATeam EF1-cpVenus có đáp ứng với ATP ở mức millimole nhưng rất thấp, dynamic range cao nhất của ATeam EF1-cp172Venus cũng chỉ 36.3% (Hình 4.1 và Bảng 4.1). Có thể sự sai sót trong khi tạo các dạng circular permuted Venus đã làm cho các cpVenus không thể giúp cải thiện hiệu ứng FRET giữa CFP và Venus. Mặt khác, không giống những ATeam khác, ở nhóm ATeam này cường độ huỳnh quang của CFP tăng và cường độ huỳnh quang của Venus giảm khi gia tăng nồng độ ATP. Kết quả này không đủ để chứng minh rằng tiểu đơn vị EF1 ϵ đã giãn ra khi kết hợp với ATP, điều này ngược với các kết quả nghiên cứu về cấu trúc tinh thể của TF₁- ϵ khi gắn với ATP. Bởi vì hiệu ứng FRET nhạy với cả khoảng cách và sự định hướng tương đối giữa hai phân tử huỳnh quang,

do đó, kết quả trên có thể là do những thay đổi về hình thể của EF1ε khi kết hợp với ATP đã dẫn đến những thay đổi về định hướng tương đối của hai phân tử CFP và Venus ngăn cản khả năng nhận ánh sáng kích thích từ CFP của Venus.

Tuy nhiên, dynamic range của nhóm ATeam này quá thấp để có thể được sử dụng như là một phân tử chỉ thị nồng độ ATP trong tế bào.

Nhóm ATeam BME-nVenus và ATeam BME-cpVenus có ái lực với MgATP ở mức millimole nhưng sự thay đổi của tín hiệu FRET ở các mức độ khác nhau của MgATP cao hơn so với nhóm ATeam của EF1ε. Ở nhóm ATeam này, chúng ta có thể thấy được ảnh hưởng của các circular permutated Venus lên hiệu ứng FRET giữa CFP và Venus qua sự khác biệt rõ rệt về quang phổ huỳnh quang của các ATeam. Trong đó, cp173Venus đã giúp cải thiện đáng kể hiệu ứng FRET của ATeam BME-cp173Venus, đặc biệt trong khoảng từ 0 mM đến 5 mM MgATP. Sự thay đổi của FRET trong khoảng này đủ lớn để ATeam BME-cp173Venus có thể được sử dụng như một ATP sensor trong tế bào sống. Các đặc tính khác của ATeam này cũng được xác định như hằng số phân ly của ATeam và ATP ($K'd = 3.36$), Hill coefficient ($n = 2.04$) và tốc độ đáp ứng của ATeam với MgATP ở các nồng độ khác nhau sẽ giúp cho việc ứng dụng ATeam này vào các nghiên cứu trong tế bào.

ATeam BPF-nVenus và ATeam BCL-nVenus có đặc tính giống nhau là cả hai cùng có ái lực với MgATP trong khoảng từ 100 μ M đến 1 mM, tuy nhiên, sự thay đổi tín hiệu FRET ở các nồng độ MgATP khác nhau của ATeam BPF-nVenus rất thấp so với ATeam BCL-nVenus (Hình 4.8 và Hình 4.9). Song, ATeam BCL-nVenus có lại khuynh hướng kết tụ với nhau. Để giải quyết vấn đề này, các đột biến thay thế amino acid đã được tạo ra nhưng không đem lại hiệu quả:

- Đột biến thay đổi nhóm 4 amino acid kỵ nước I9T/V42K/F67N/L78N: kết quả thử sắc ký lọc gel cho thấy các protein vẫn kết dính với nhau. Tuy nhiên, ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N)-cp157Venus và ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N)-cp173Venus lại đáp ứng với MgATP ở mức millimole.

Có hai khả năng gây ra hiện tượng này. Thứ nhất, các đột biến thay thế amino acid đã làm thay đổi ái lực của BCL ϵ với MgATP. Thứ hai, do các cpVenus bởi vì Venus gắn vào đầu C của tiểu đơn vị ϵ . Vị trí gắn của ATP cũng nằm ở đầu C của phân tử ϵ (Yagi và ctv.,2007), do đó, các cpVenus có thể ảnh hưởng đến sự co lại của hai chuỗi α trong phân tử ϵ và sự hình thành cấu trúc kẹp tóc của hai chuỗi này để gắn với ATP. Từ đó, thay đổi ái lực của ATeam BCL((I9T/V42K/F67N/L78N)-cp157Venus và ATeam BCL((I9T/V42K/F67N/L78N)-cp173Venus với MgATP. Vì không thu được ATeam BCL((I9T/V42K/F67N/L78N)-nVenus để làm đối chứng nên không thể kết luận được do nguyên nhân nào.

- Đột biến P85A: ATeam BCL(P85A)-nVenus và ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N/P85A)-nVenus. Từ kết quả thí nghiệm với ATeam BCL(P85A)-nVenus, có thể khẳng định rằng Pro85 không phải là nguyên nhân gây ra hiện tượng kết tụ của protein. Về ái lực với ATP, ATeam BCL(P85A)-nVenus có ái lực tương tự như ATeam BCL-nVenus. Tuy nhiên, sự thay đổi của tín hiệu FRET ở các nồng độ MgATP khác nhau thấp hơn ATeam BCL-nVenus. Như vậy, đột biến P85A đã có ảnh hưởng đến BCL ϵ . Trong trường hợp của ATeam BCL(I9T/V42K/F67N/L78N/P85A)-nVenus, do phân tử này mang quá nhiều đột biến đã dẫn đến sự thay đổi tính chất của BCL ϵ , làm cho phân tử này trở nên bất hoạt.

Chương 5

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. Kết luận:

Nhóm ATeam với EF1ε

– Cấu trúc và biểu hiện được các ATeam: EF1ε-nVenus, EF1ε-cp49Venus, EF1ε-cp156Venus, EF1ε-cp172Venus, EF1ε-cp194Venus, EF1ε-cp228Venus. Riêng ATeam EF1-cp49Venus không được biểu hiện khi nuôi cấy *E.coli* JM109 (DE3) trong môi trường LB lỏng mặc dù protein được biểu hiện khi nuôi cấy *E.coli* trên thạch LB.

– Theo kết quả đánh giá *in vitro*, EF1ε có ái lực với ATP ở mức millimole nhưng sự thay đổi tín hiệu FRET khi tăng nồng độ ATP là rất thấp. Do đó, không thể sử dụng nhóm ATeam này để theo dõi sự thay đổi nồng độ ATP trong tế bào.

Nhóm ATeam BME-nVenus và ATeam BME-cpVenus

– Cấu trúc và biểu hiện thành công các ATeam: BME-nVenus, BME-cp50Venus, BME-cp157Venus, BME-cp173Venus, BME-cp195Venus.

– Theo kết quả đánh giá *in vitro*, BMEε có ái lực với MgATP ở mức millimole. Trong đó, ATeam BME-cp173Venus là ATeam nổi bật nhất vì có sự thay đổi đáng kể tín hiệu FRET trong khoảng từ 0 đến 5 mM, thích hợp để chỉ thị nồng độ ATP trong tế bào.

– ATeam BME-cp173Venus có hằng số phân ly với MgATP là 3.36, Hill coefficient là 2.04.

Nhóm ATeam với BCLε và các dạng đột biến của tiểu đơn vị này

– Cấu trúc và biểu hiện được các ATeam: BCL-nVenus, BCL (I9T/V42K/F67N/L78N) - cp157Venus, BCL (I9T/V42K/F67N/L78N) -

- cp173Venus, BCL(P85A)-nVenus, BCL(I9T/V42K/F67N/L78N/P85A)-nVenus.
- Theo kết quả đánh giá *in vitro*, ATeam BCL-nVenus đáp ứng với MgATP ở mức từ 100 μ M đến 1 mM và ATeam này cũng có sự thay đổi rất đáng kể về tín hiệu FRET giữa các nồng độ khác nhau của MgATP trong khoảng này.
 - ATeam BCL-nVenus tồn tại dưới hai dạng: dạng đơn phân và dạng đa phân tử. Tín hiệu FRET của dạng đa phân tử thấp hơn nhiều so với dạng đơn phân.
 - Để loại bỏ hiện tượng đa phân tử, các đột biến thay thế amino acid như I9T/V42K/F67N/L78N, P85A và I9T/V42K/F67N/L78N/P85A đã được thử nghiệm nhưng đều không mang lại hiệu quả.
 - ATeam BCL (I9T/V42K/F67N/L78N)-cp157Venus, BCL (I9T/V42K/F67N/L78N)-cp173Venus có ái lực với MgATP ở mức millimole.
 - Ateam BCL (P85A)-nVenus có ái lực với MgATP trong khoảng từ 100 μ M đến 1000 μ M nhưng dynamic range thấp hơn so với ATeam BCL-nVenus.
 - ATeam BCL (I9T/V42K/F67N/L78N/P85A)-nVenus là một Ateam bất hoạt.
 - Tuy nhiên, ATeam BCL-nVenus là một ATP sensor có triển vọng được sử dụng để xác định nồng độ ATP trong tế bào sống.

ATeam BPF-nVenus

- Cấu trúc và biểu hiện được ATeam BPF-nVenus trong tế bào *E.coli*.
- ATeam này cũng có ái lực với MgATP trong khoảng từ 100 μ M đến 1 mM nhưng sự thay đổi cường độ huỳnh quang của CFP và Venus trong khoảng này rất thấp. Do đó, không thể sử dụng ATeam này để chỉ thị nồng độ ATP trong tế bào.

5.2. Đề nghị:

Trong thời gian ngắn làm khoá luận này, những kết quả thu được chỉ là những kết quả bước đầu. Nếu có thể, xin đề nghị tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về các tính chất của ATeam như:

- Nghiên cứu về cấu trúc tinh thể của ATeam với EF1 ϵ khi kết hợp với ATP để tìm ra nguyên nhân sự tăng cường độ huỳnh quang của CFP và giảm cường độ huỳnh quang của Venus.
- Khảo sát ái lực của ATeam BME-cp173Venus với ADP, GTP, CTP và UTP.
- Tìm hiểu nguyên nhân gây ra hiện tượng đa phân tử ở protein ATeam BCL-nVenus.
- Cấu trúc các ATeam với BCL ϵ và circular permutated Venus và khảo sát sự thay đổi của tín hiệu FRET ở các nồng độ khác nhau của MgATP.
- Ứng dụng ATeam BME-cp173Venus vào việc nghiên cứu nồng độ ATP trong tế bào sống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT:

1. Nguyễn Phước Nhuận, Phan Thế Đồng, Lê Thị Phương Hồng, Đỗ Hiếu Liêm, Đinh Ngọc Loan, 2003. *Giáo trình Sinh hoá học (Phần 1: Sinh hoá học tĩnh)*. NXB Đại học quốc gia TP Hồ Chí Minh. Trang 46-73.
2. Nguyễn Phước Nhuận, Phan Thế Đồng, Lê Thị Phương Hồng, Đỗ Hiếu Liêm, Đinh Ngọc Loan, 2003. *Giáo trình Sinh hoá học (Phần 2: Trao đổi chất và năng lượng)*. NXB Đại học quốc gia TP Hồ Chí Minh. Trang 7-32.
3. Bùi Trang Việt, 2003. *Sinh học tế bào*. NXB Đại học quốc gia TP Hồ Chí Minh. Trang 182-204.

TÀI LIỆU TIẾNG NƯỚC NGOÀI:

4. Jeremy M.Berg, John L.Tymoczko, Lubert Stryer. *Biochemistry*, sixth edition. W.H. Freeman and Company, New York, p. 37-39, p. 268-269, p. 522-523 và p.412-413.
5. Gerald Karp, *Cell and Molecular Biology – concepts and experiments*, fourth edition. John Wiley & Sons, Inc., USA, p. 203-205.
6. Alejandro G. Marangoni, 2003. *Enzyme Kinetics – a modern approach*. John Wiley & Sons, Inc., USA, p. 44-52, p. 102-109.
7. Atsushi Miyawaki, Juan Llopis, Roger Heim, J. Michael McCaffery, Joseph A.Adams, Mitsuhiro Ikura and Roger Y.Tsien, 1997. **Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin**. *Nature* **388**: p.882-887. Nature Macmillan Publishers Ltd.
8. Yasuyuki Kato-Yamada and Masasuke Yoshida, 2003. **Isolated ϵ subunit of Thermophilic F1-ATPase binds ATP**. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: p.36013-36016. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. USA.

9. Ryota Iino, Tomoe Murakami, Satoshi Iizuka, Yasuyuki Kato-Yamada, Toshiharu Suzuki and Masasuke Yoshida, 2005. **Real-time monitoring of conformational dynamics of the ϵ subunit in F1-ATPase.** *The Journal of Biological Chemistry* **280**: p.40130-40134. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. USA.
10. Toshiharu Suzuki, Tomoe Murakami, Ryota Iino, Junko Suzuki, Sakurako Ono, Yasuo Shirakihara and Masasuke Yoshida, 2003. **F₀F₁-ATPase/synthase is geared to the synthesis mode by conformational rearrangement of ϵ subunit in response to proton motive force and ADP/ATP balance.** *The Journal of Biological Chemistry* **278**: p. 46840-46846. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. USA.
11. Hiromasa Yagi, Nobumato Kajiwara, Hideaki Tanaka, Tomitake Tsukihara, Yasuyuki Kato-Yamada, Masasuke Yoshida and Hideo Akutsu, 2007. **Structures of the thermophilic F₁-ATPase ϵ subunit suggesting ATP-regulated arm motion of its C-terminal domain in F₁.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: p. 11233-11238.
12. Takeharu Nagai, Shuichi Yamada, Takashi Tomonaga, Michinori Ichikawa, and Atsushi Miyawaki, 2004. **Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca²⁺ by circularly permuted yellow fluorescent proteins.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: p.10554-10559.
13. Geoffrey S. Baird, David A. Zacharias, and Roger Y. Tsien, 1999. **Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**: p. 11241-11246
14. Toshiharu Suzuki, Tomoe Murakami, Ryota Iino, Junko Suzuki, Sakurako Ono, Yasuo Shirakihara, and Masasuke Yoshida, 2003. **F₀F₁-ATPase/synthase is geared to the synthesis mode by conformational rearrangement of ϵ subunit response to proton motive force and ADP/ATP balance.** *The Journal of Biological Chemistry* **278**: p.

46840-46846. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. USA.

15. Takeharu Nagai, Keiji Ibata, Eun Sun Park, Mie Kubota, Katsuhiko Mikoshiba, and Atsushi Miyawaki, 2002. **A variants of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications.** *Nature biotechnology* **20**: p.87-90
16. Atsushi Miyawaki, 2003. **Visualization of the spatial and temporal dynamics of intracellular signaling.** *Developmental Cell* **4**: p.295-305. Cell Press.
17. Marieke Willemse, Edwin Janssen, Frank de Lange, Bé Wieringa, Jack Fransen, 2007. **ATP and FRET – a cautionary note.** *Nature biotechnology* **25**: p.170-172.

TÀI LIỆU THAM KHẢO TỪ HỆ THỐNG INTERNET:

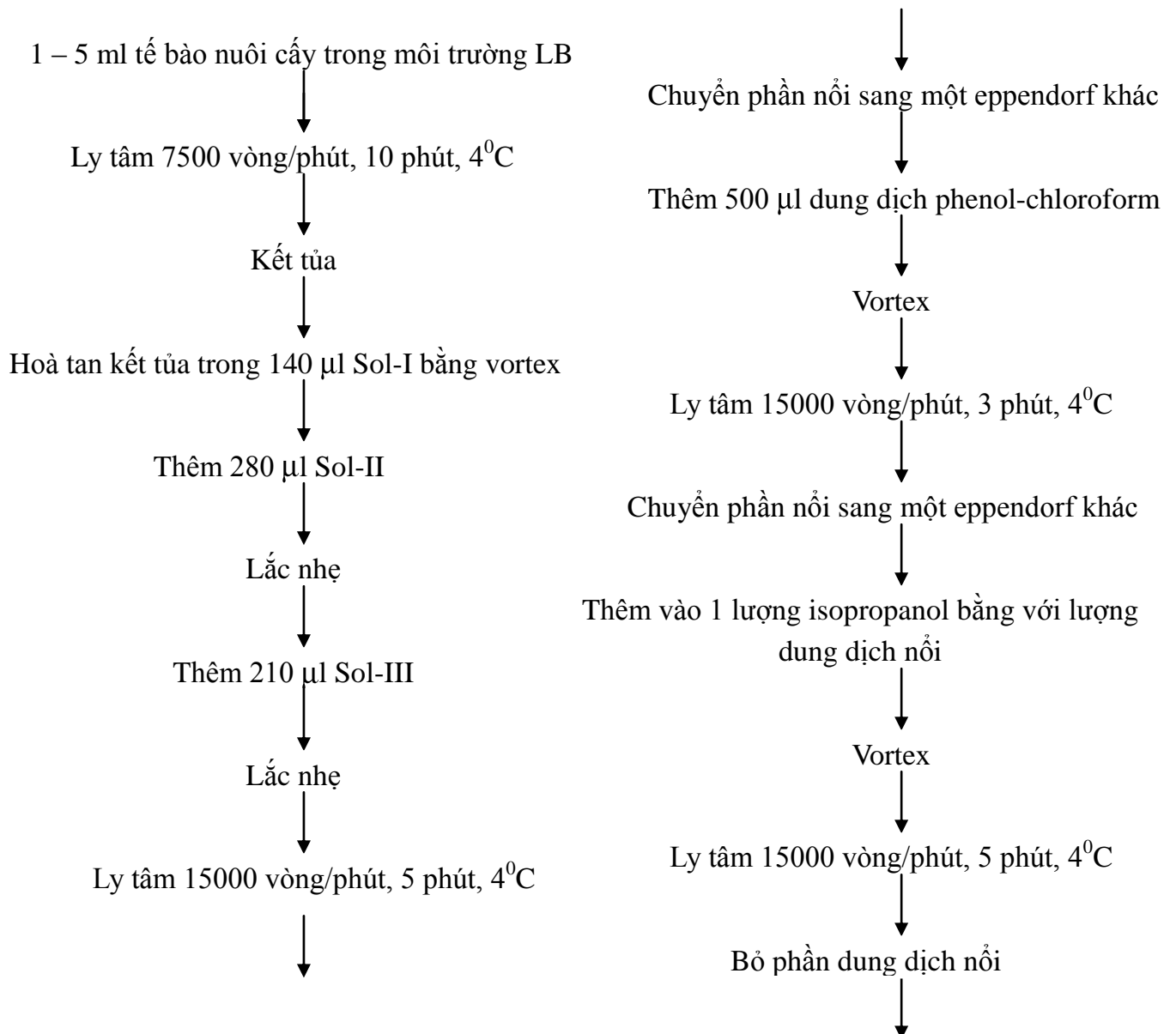
18. ES Pript 2.2 website:
<URL: <http://espript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>>
19. Phần mềm PyMOL:
<URL: <http://pymol.sourceforge.net/>>
20. A. Rekas, J.R. Alattia, T. Nagai, A. Miyawaki, M. Ikuwa, 2002. **Crystal structure of Venus, a yellow fluorescent protein with improved maturation and reduced environmental sensitivity.** *The Journal of Biological Chemistry* **277**: p.50573-50578.
<URL: http://www.pdbj.org/pdb_nc/pdb1myw.ent>
21. Joachim Weber, **ATP synthase – the world’s smallest rotary motor.**
<URL: <http://www.depts.ttu.edu/chemistry/faculty/weber/NSMB1c2.jpg>>

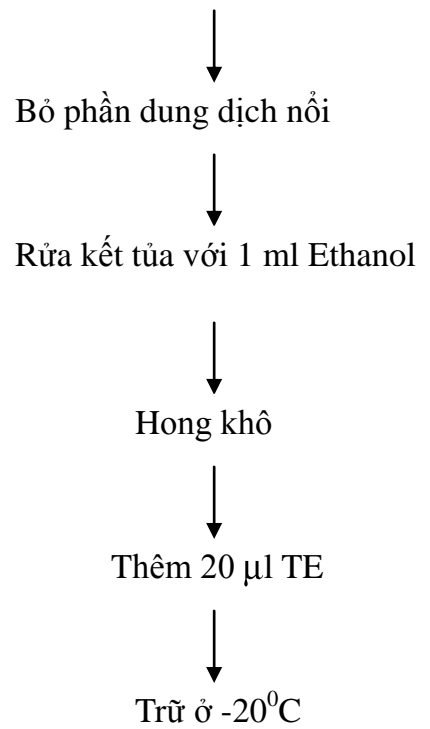
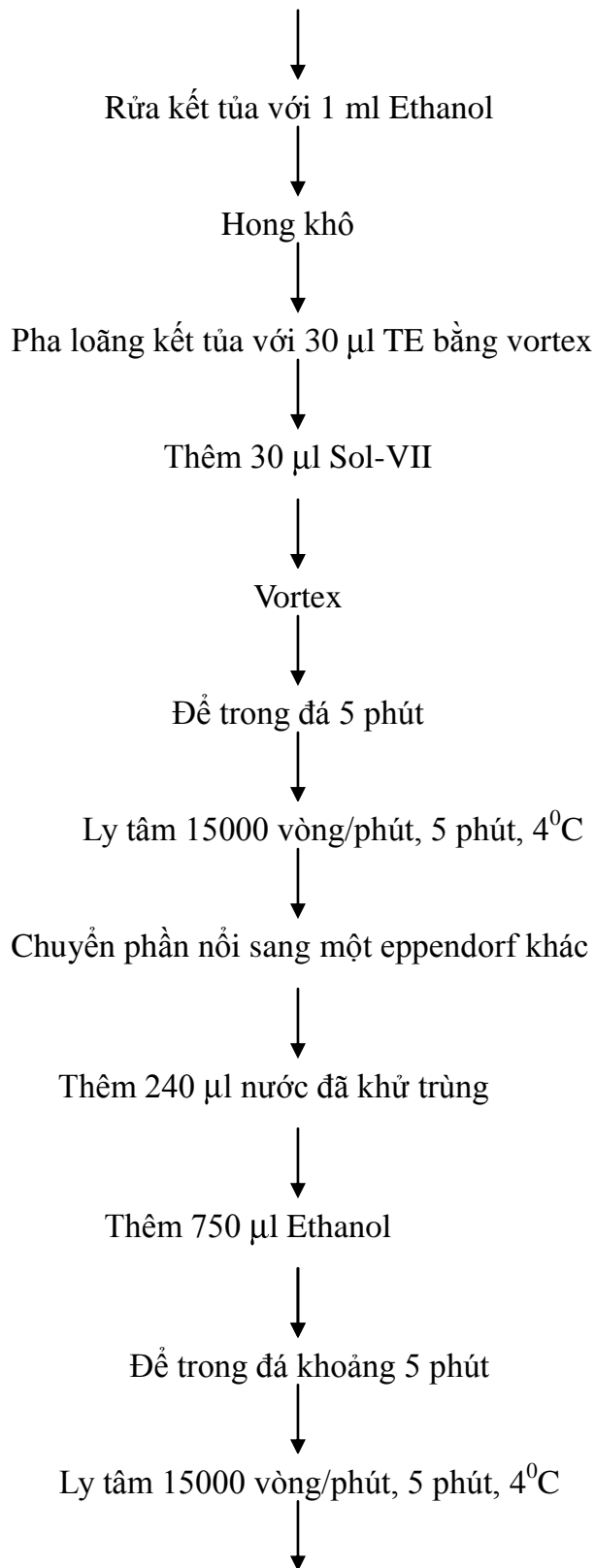
PHỤ LỤC

1. Công thức môi trường LB

<i>Thành phần</i>	<i>Nồng độ (g/l)</i>
Tryptone	10
Yeast extract	5
NaCl	10

2. Quy trình tinh sạch plasmid





Dung dịch Sol-I

50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA

Dung dịch Sol-II

0.2 N NaOH, 1% SDS

Dung dịch Sol-III

3 M potassium acetate (pH 4.8)

Dung dịch Sol-VII

5 M LiCl, 50 mM Tris-HCl (pH8.0)