

Thu nhận protein p24 được biểu hiện trong *Bacillus subtilis* và đánh giá khả năng gây đáp ứng miễn dịch trên chuột

- Trương Thị Tinh Tươi
- Phan Thị Phượng Trang
- Nguyễn Đức Hoàng

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Nhận ngày 18 tháng 10 năm 2016, đăng bài ngày 10 tháng 04 năm 2017)

TÓM TẮT

p24 là một trong những protein cấu thành capsid của Human immunodeficiency virus (HIV). Trong quá trình xâm nhiễm, HIV đưa cả capsid này vào tế bào chủ nhằm thực hiện một số vai trò quan trọng trong các giai đoạn sống của virus trong tế bào chủ. Do đó, protein p24 có tiềm năng ứng dụng trong phát triển vaccine ngăn ngừa HIV. Với định hướng sử dụng p24 làm vaccine, nghiên cứu này tiến hành tạo chủng *Bacillus subtilis* có khả năng biểu hiện protein p24 và thu nhận protein này. Đây là chủng vi sinh vật an toàn, không gây độc cho người và động vật, đã có

hệ thống biểu hiện cho phép biểu hiện vượt mức protein tái tổ hợp lên đến 10-30% so với protein tổng số. Plasmid tái tổ hợp pHT1537 mang gene gagp24 mã hóa cho protein p24 được dung hợp với đuôi LysSN-6His đã được dòng hóa thành công, cho phép biểu hiện protein p24 trong *B. subtilis* dưới sự cảm ứng của IPTG. Sự hiện diện của protein p24 dung hợp được kiểm tra bằng phương pháp SDS-PAGE. Protein này được thu nhận bằng cột ái lực chứa Ni²⁺. Đánh giá khả năng tạo kháng thể kháng protein p24 ở chuột bằng thử nghiệm ELISA và Western blot.

Từ khóa: HIV, p24, gagp24, protein tái tổ hợp, *Bacillus subtilis*

MỞ ĐẦU

HIV đã gây bùng nổ đại dịch HIV/AIDS trong những năm gần đây kể từ khi trường hợp nhiễm đầu tiên được phát hiện vào năm 1983, để lại những hậu quả nặng nề như: tác động nghiêm trọng đến nền kinh tế, chính trị như gia tăng nghèo đói, bất ổn xã hội và giảm chất lượng dân số [9]. Hiện nay đã có nhiều nghiên cứu được tiến hành nhằm tìm ra liệu pháp điều trị HIV như: nghiên cứu các gene mã hóa protease của virus để ngăn chặn sự xâm nhiễm từ tế bào này qua tế bào khác hay biểu hiện protein P24 để sản xuất kit phát hiện sớm cũng như giúp theo dõi trong quá trình điều trị HIV [1, 3, 5, 6]. Song song với các nghiên cứu điều trị là sản xuất vaccine để phòng ngừa và hạn chế lây nhiễm. Trong đó, để ngăn chặn khả

năng lây lan của HIV, protein p24 được quan tâm nhiều do p24 đã được chứng minh là kháng nguyên đặc hiệu có tính gây đáp ứng miễn dịch cao và cũng là thành phần của capsid giúp bảo vệ nucleic acid của HIV trong tế bào chủ [4]. Gần đây, nhóm tác giả de Souza (năm 2014) đã sử dụng protein p24 làm kháng nguyên để đánh giá khả năng tăng đáp ứng miễn dịch trên chuột khi sử dụng bào tử *B. subtilis* làm tá dược vaccine [10]. Với định hướng nghiên cứu sử dụng vi sinh vật sản xuất kháng nguyên, việc biểu hiện protein p24 tái tổ hợp trên hệ thống *E. coli* gặp nhiều hạn chế do chủng chủ có chứa độc tố và dễ tạo thể vùi. Chính vì vậy, cần phải tạo chủng an toàn hơn và có khả năng biểu hiện protein ở dạng hòa tan. Vì

khuẩn *B. subtilis* là tế bào chủ tiềm năng với nhiều ưu điểm: (i) là vi khuẩn an toàn, không gây bệnh, không sinh độc tố, (ii) có hệ thống biểu hiện đã được thương mại và (iii) protein tái tổ hợp có thể biểu hiện lên đến 10–30 % protein tổng số [2, 8, 8]. Nghiên cứu này đã sử dụng vector pHT1055B có chứa promoter mạnh *P_{grac100}* giúp biểu hiện vượt mức protein p24 trong *B. subtilis* dưới sự điều hòa cảm ứng của IPTG.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các plasmid được cung cấp bởi Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh. Trong đó, plasmid pHT1531 mang gene *lysSN-6his-gagp24* mã hóa protein p24 dung hợp với LysSN-6His được sử dụng làm khuôn cho phản ứng

PCR và plasmid pHT1055B có mang promoter mạnh *P_{grac100}* là vector con thoi cho phép tạo dòng trong *E. coli* và biểu hiện protein p24 dung hợp trong *B. subtilis*.

Chủng *E. coli* OmniMAX (F' {*proAB+ lacIq lacZΔM15 Tn10(TetR) Δ(ccdAB)*} *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80(lacZ)ΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD*) dùng để dòng hóa.

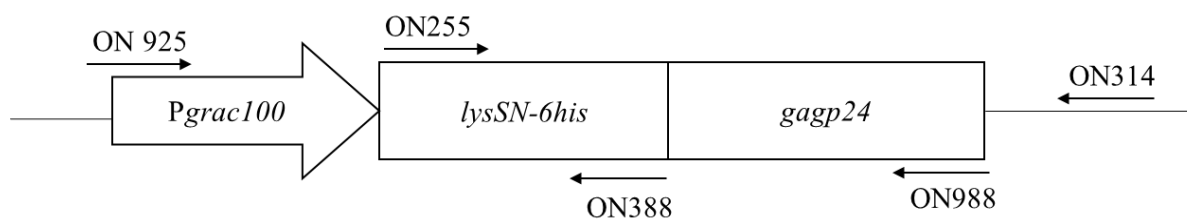
Chủng *B. subtilis* 1012 (*leuA8 metB5 trpC2 hsdRM1*) dùng để biểu hiện gene.

Các môi oligonucleotide được sử dụng trong phản ứng PCR thu gene cũng như phản ứng PCR khuếch tán và giải trình tự được thiết kế có trình tự như Bảng 1 được tổng hợp bởi công ty Macrogen (Hàn Quốc).

Bảng 1. Trình tự các môi được sử dụng

STT	Tên môi	Trình tự môi (5'-3')	Mục đích
1	ON255	GGCCATGGTCTCAGATCTATGAGTCAAGA AGAACATAACCATGAAGAATTGAATGATC	Nhân bản gene
2	ON988	TAGGCGGGCTGCCCCGGGTACCGATATCT TACGCTAATACAC	Nhân bản gene
3	ON388	ATGCATCCATGGATCCCTGGAAGTACAGG TTCTCACCGC	PCR khuếch tán
4	ON925	GAATTAGCTTGGTACCAAAGGAGGTAAGG ATCACTAG	PCR khuếch tán, giải trình tự
5	ON314	TGTTTCAACCATTGTGTTCCAGGT	Giải trình tự

Vị trí bắt cặp của môi lên khuôn được thể hiện như trong Hình 1.



Hình 1. Sơ đồ vị trí các mồi bắt cặp lên khuôn

Enzyme *Deepvent* DNA polymerase và *Taq* DNA polymerase được cung cấp bởi công ty New England Biolabs (Mỹ). Enzyme nối T4 DNA ligase được cung cấp bởi công ty Fermentas (Đức). Các enzyme cắt giới hạn bao gồm *Bam*HI, *Sma*I, *Eco*31I và *Eco*RV được cung cấp bởi công ty Fermentas (Đức).

Protein p24 chuẩn được cung cấp bởi GS. Luis Ferreira, Trường Đại học São Paulo, Brazil.

Chuột *Mus musculus* có trọng lượng từ 18–20 g/con được mua từ Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh.

Phương pháp

Tạo dòng vector pHT1537

Thu nhận gene *lysSN-6his-gagp24* bằng phản ứng PCR với khuôn plasmid pHT1531 và cặp mồi đặc hiệu ON255 và ON988. Thành phần phản ứng PCR: 1X *Deepvent* buffer, 200 μ M dNTP, 0,25 pmol mồi; 50 ng pHT1531; 2 U *Deepvent* DNA polymerase. Phản ứng được thực hiện trong 30 chu kỳ gồm các bước 95 °C/30s, 55 °C/30s, 72 °C/45s. Tinh sạch sản phẩm PCR bằng bộ kit QIAquick PCR purification (Qiagen).

Plasmid pHT1055B được cắt mở vòng với hai enzyme cắt giới hạn *Bam*HI và *Sma*I, sau đó được nối với gene *gagp24* đã được xử lý với *Eco*31I và *Eco*RV bằng T4 DNA ligase để tạo plasmid tái tổ hợp pHT1537. Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* OmniMAX khả nạp. Sàng lọc các dòng mang plasmid tái tổ hợp bằng phản ứng PCR khuôn lạc với cặp mồi ON925 và ON388 (Sơ đồ mồi được thể hiện

trong Hình 1). Thành phần phản ứng PCR khuôn lạc gồm: 1 X *Taq* buffer; 200 μ M dNTP; 0,25 pmol mồi; 1 U *Taq* DNA polymerase. Phản ứng được thực hiện trong 30 chu kỳ gồm các bước 95 °C/30s, 55 °C/30s, 72 °C/45s.

Khuẩn lạc cho kết quả dương tính với PCR khuôn lạc được nuôi cấy và tách chiết plasmid bằng bộ kit QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen). Đoạn gene chèn trong plasmid được giải trình tự bởi công ty Macrogen (Hàn Quốc).

Biểu hiện protein p24 trong *B. subtilis*

Biến nạp plasmid tái tổ hợp pHT1537 vào tế bào *B. subtilis* 1012 theo phương pháp biến nạp tự nhiên. Các khuẩn lạc mọc trên môi trường LB-Agar có bổ sung kháng sinh chloramphenicol (Cm) với nồng độ cuối 10 μ g/mL được nuôi cấy hoạt hóa qua đêm ở 37 °C trong môi trường LB-Cm và cảm ứng biểu hiện bằng IPTG với nồng độ 0,1 mM tại thời điểm OD₆₀₀ đạt 0,8. Thời gian thu mẫu là 4 giờ sau cảm ứng. Kiểm tra sự biểu hiện protein thông qua phương pháp SDS-PAGE, đối chứng âm là chủng *B. subtilis* mang plasmid pHT01.

Kiểm tra sự biểu hiện tan của protein p24

Hòa sinh khối tế bào vi khuẩn trong dung dịch đệm (phosphate 30 mM, imidazole 5 mM và glycerol 10 %). Ly giải tế bào bằng sóng siêu âm trong bồn đá. Ly tâm nhẹ ở 2000 g trong 1 phút để loại các tế bào chưa vỡ. Dịch protein tổng được ly tâm 13.000 g trong 5 phút để phân tách thành phân đoạn tủa và phân đoạn tan. Sử dụng phương pháp SDS-PAGE để

kiểm tra tính tan của protein mục tiêu trong các phân đoạn.

Tinh chế protein p24

Tiến hành nuôi cấy vi khuẩn *B. subtilis* mang plasmid pHT1537 trong 3 lít môi trường. Huyền phù sinh khối với 3 thể tích (so với trọng lượng sinh khối) dung dịch đệm (phosphate 30 mM pH8, imidazole 5 mM, glycerol 10%, 1 mg/mL DnaseI, 1 mM PMSF và 1 mg/mL lysozyme). Phá tế bào bằng sóng siêu âm trong trong bồn đá với cường độ sóng (Amplitude) 70 trong 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 10 giây phá và 20 giây nghỉ. Ly tâm 13.000 g trong 30 phút ở 4°C, dịch nổi thu được cho chảy qua cột Histrap HP 1mL (GE Healthcare), rửa cột bằng dung dịch rửa (phosphate 30 mM, imidazole 10 mM và glycerol 10%) với thể tích gấp 20 lần thể tích cột. Dung ly protein mục tiêu bằng dung dịch dung ly có thành phần giống dung dịch rửa với nồng độ imidazole theo gradient từ 20-150 mM.

Gây đáp ứng miễn dịch kháng protein p24 ở chuột và đánh giá kháng thể tạo ra bằng ELISA

Trộn protein p24 dung hợp sau khi tinh chế với tá chất aluminum theo tỉ lệ 1:1 và tiêm với nồng độ 50 µg protein/con/lần tiêm vào dưới da chuột *Mus musculus* có trọng lượng từ 18-20 g/con. Mỗi lô thí nghiệm gồm 1 con tiêm tá chất aluminum và 5 con tiêm protein p24, thực hiện 4 lần tiêm: 1 lần tiêm khởi đầu vào ngày thứ 7 và 3 lần tiêm nhắc, mỗi lần cách nhau 2 tuần. huyết thanh chuột được thu nhận trước khi tiêm gây đáp ứng miễn dịch lần đầu và sau lần tiêm nhắc thứ 3. Đánh giá hiệu quả gây đáp ứng miễn dịch bằng phương pháp ELISA gián tiếp: gắn protein p24 dung hợp lên giếng ELISA với nồng độ 5 µg/mL, rửa sạch và ủ với kháng thể sơ cấp là huyết thanh chuột thu được, kháng thể thứ cấp là anti IgG mouse có gắn enzyme horseradish

peroxidase. Sử dụng cơ chất là TMB (-3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) để tạo màu, sau đó dùng phản ứng bằng HCl 1 N. Đo màu trên máy đọc đĩa ở bước sóng 450 nm.

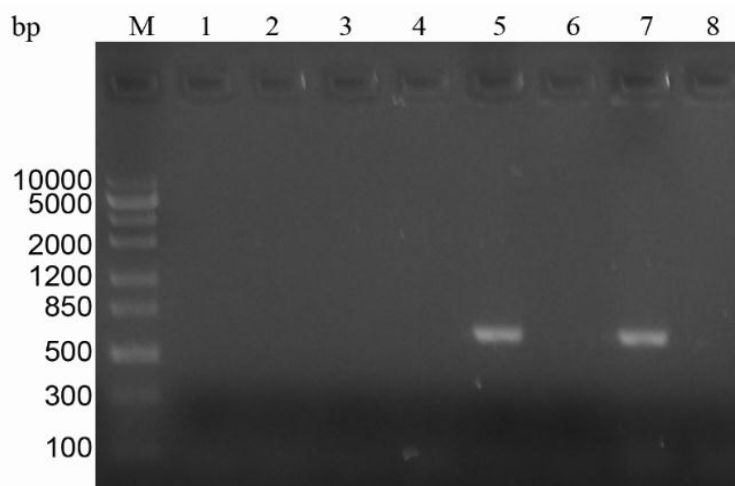
Kiểm tra tính đặc hiệu của kháng thể kháng protein p24 bằng Western blot

Do protein kháng nguyên là dạng dung hợp của P24 với LysSN nên kháng thể tạo ra cần được kiểm chứng khả năng gây đáp ứng miễn dịch cho p24 hay LysSN. Phương pháp Western blot được thực hiện với việc sử dụng protein p24 chuẩn được cung cấp bởi GS. Luis Ferreira, Trường Đại học São Paulo, Brazil làm mẫu dương có nồng độ 6µg/µL. Các mẫu đối chứng âm gồm có tế bào *B. subtilis* mang plasmid pHT01 (không mang gene lysSN-6his-gagp24) và pHT364b (mang gene lysSN-6his). Kháng thể sơ cấp là huyết thanh chuột được tiêm protein LysSN-6His-P24. Kháng thể thứ cấp là anti IgG Mouse có gắn enzyme horseradish peroxidase, sử dụng cơ chất là TMB.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tạo dòng vector pHT1537

Gene lysSN-6his-gagp24 được thu nhận thông qua phản ứng PCR, có kích thước 1255 bp. Gene này được gắn chèn vào plasmid pHT1055B tại vị trí cắt của *Bam*HI và *Sma*I tạo plasmid tái tổ hợp pHT1537 và được biến nạp vào *E. coli* OmniMAX khả nạp. Sàng lọc các dòng mang plasmid tái tổ hợp bằng kháng sinh ampicillin (Amp) và PCR khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu là ON388 bắt trên gene lysSN-6his-gagp24 và ON925 bắt trên plasmid gốc. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc trên Hình 2 cho thấy có khuẩn lạc 5, 7 đều cho vạch DNA dương tính với kích thước khoảng 667 bp tương ứng với kích thước đã dự đoán trên lý thuyết.



Hình 2. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuẩn lạc trên gel agarose 1%

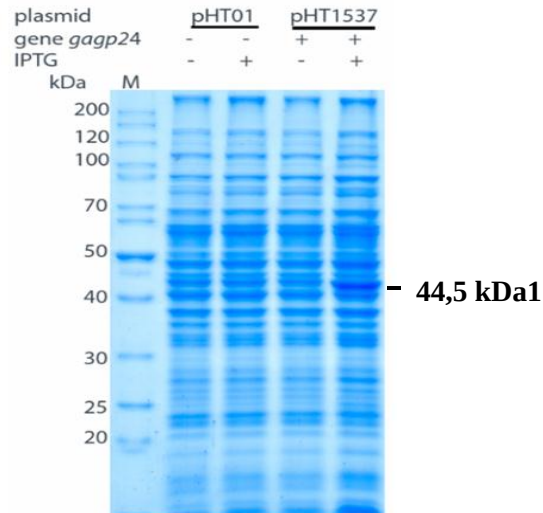
M: thang chuẩn; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8: sản phẩm PCR khuẩn lạc từ khuẩn lạc 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8

Chọn khuẩn lạc 5 để nuôi cấy, tách chiết plasmid và gửi giải trình tự. Kết quả giải trình tự cho thấy có sự tương đồng 100 % giữa trình tự được giải và trình tự trên lý thuyết. Như vậy đã tạo dòng thành công plasmid tái tổ hợp pHT1537.

Kết quả kiểm tra biểu hiện của protein p24 trong *B. subtilis*

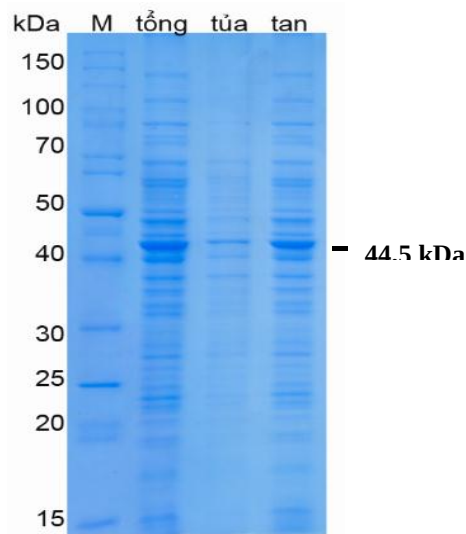
Plasmid pHT1537 mang gene *gagp24* được dung hợp với gene *lysSN* nhằm để tăng cường biểu hiện protein mục tiêu trong *B. subtilis*. Plasmid này được biến nạp vào vi khuẩn *B. subtilis* 1012. Kiểm tra sự cảm ứng biểu hiện protein tái tổ hợp bằng phương

pháp SDS-PAGE. Kết quả điện di trên gel SDS-PAGE cho thấy so với chủng *B. subtilis* 1012 có mang plasmid pHT1537 nhưng không được cảm ứng IPTG (Hình 3, giếng pHT1537 +, -) và chứng âm là chủng *B. subtilis* 1012 mang plasmid pHT01 không mang gene *lysSN-6his-gagp24* thì chủng *B. subtilis* 1012 mang plasmid pHT1537 sau khi cảm ứng xuất hiện vạch protein mục tiêu có kích thước khoảng 44,5 kDa (Hình 3, giếng pHT1537 +, +). Kết quả này cho thấy protein p24 dung hợp được cảm ứng biểu hiện bằng IPTG có kích thước khoảng 44,5 kDa.



Hình 3. Kết quả kiểm tra biểu hiện protein P24 trong *B. subtilis* bằng SDS-PAGE.

M: thang chuẩn; pHT01 (-, -): chủng *B. subtilis* 1012/pHT01 không chứa gene *lysSN-6his-gagp24*, không cảm ứng với IPTG; pHT01 (-, +): chủng *B. subtilis* 1012/pHT01 không chứa gene *lysSN-6his-gagp24*, cảm ứng với 0,1 mM IPTG trong 4 giờ ở 37°C; pHT1537 (+, -): chủng *B. subtilis* 1012/pHT1537 có mang gene *lysSN-6his-gagp24* nhưng không cảm ứng với IPTG; pHT1537 (+, +): chủng *B. subtilis* 1012/pHT1537 có mang gene *lysSN-6his-gagp24* và được cảm ứng với 0,1 mM IPTG trong 4 giờ ở 37 °C



Hình 4. Kết quả kiểm tra tính tan của protein p24 trong *B. subtilis*

M: thang chuẩn, tổng: protein tổng số có trong tế bào *B. subtilis* 1012/pHT1537, tủa: protein trong phân đoạn tủa, tan: protein trong phân đoạn tan

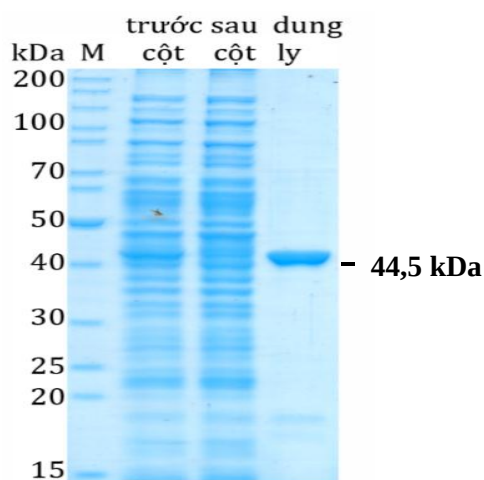
Kết quả kiểm tra sự biểu hiện tan của protein p24

Kết quả điện di các phân đoạn protein p24 dung hợp trên Hình 4 cho thấy vạch protein tái tổ hợp có kích thước 44,5 kDa hiện diện trong cả 3 pha: tổng, tủa và tan, trong đó phần lớn protein mục tiêu nằm trong pha tan. Vậy, protein p24 biểu hiện trong tế bào *B. subtilis* ở dạng hòa tan chiếm tỉ lệ cao, do đó có thể tinh chế protein tái tổ hợp từ pha tan theo phương pháp không biến tính.

Kết quả tinh chế protein p24

Do đa phần protein p24 biểu hiện trong *B. subtilis* ở dạng tan nên sử dụng phương pháp tinh chế

không biến tính để thu nhận protein này. Kết quả sau khi tinh chế được kiểm tra bằng SDS-PAGE. Kết quả phân tích trên Hình 5 cho thấy dịch protein sau khi cho qua cột gắn Ni^{2+} , vạch protein mục tiêu giảm đi rất nhiều so với trước khi qua cột. Điều đó chứng tỏ protein p24 dung hợp đã gắn lên cột. Phân đoạn sau khi dung ly với nồng độ imidazole 50 mM, thu được vạch protein mục tiêu duy nhất ở kích thước tương ứng. Như vậy, đã thu nhận thành công protein p24 dung hợp với LysSN-6His và có độ tinh sạch khá cao. Protein này được sử dụng làm kháng nguyên để đánh giá khả năng gây đáp ứng miễn dịch trên



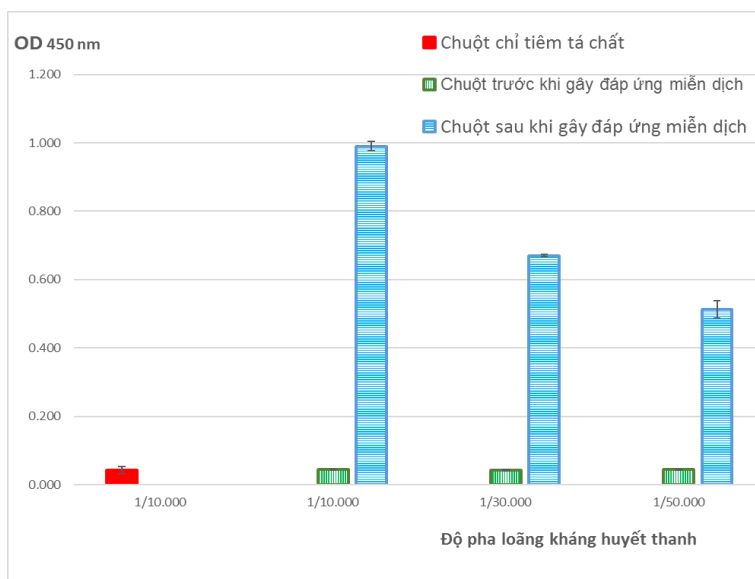
Hình 5. Kết quả tinh chế protein p24 trong *B. subtilis*

M: thang chuẩn; *trước cột:* protein trước khi qua cột; *sau cột:* protein sau khi qua cột; *dung ly:* protein sau khi được dung ly ra khỏi cột bằng dung dịch đệm chứa 50 mM imidazole.

Kết quả gây đáp ứng miễn dịch kháng protein p24 ở chuột

Protein p24 dung hợp được tiêm vào chuột *Mus musculus* để đánh giá khả năng gây đáp ứng miễn dịch, kết quả ELISA gián tiếp (Hình 6) giữa kháng huyết thanh chuột sau 3 lần tiêm nhắc với protein p24 cho thấy giá trị OD_{450} nm ở chuột sau khi tiêm cao hơn rất nhiều so với chuột được tiêm tá chất và chuột trước khi tiêm protein p24 ở cả 3 độ pha loãng của kháng huyết thanh chuột là 10.000, 30.000 và 50.000

lần. Giá trị OD_{450} nm giảm dần theo độ pha loãng của kháng huyết thanh. Điều này chứng tỏ trong huyết thanh của chuột thí nghiệm có sự gia tăng một cách đáng kể kháng thể đặc hiệu kháng protein p24 dung hợp. Như vậy, quá trình gây đáp ứng miễn dịch chủ động ở chuột với kháng nguyên p24 khá hiệu quả.

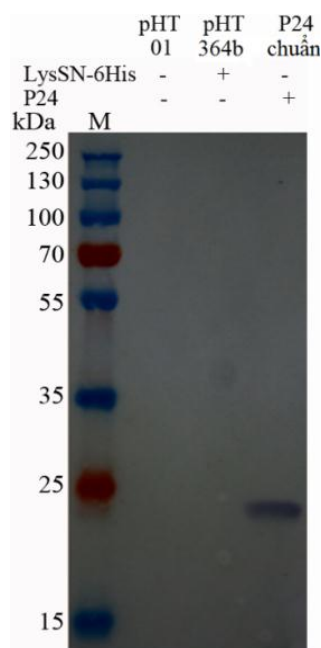


Hình 6. Kết quả ELISA đánh giá hiệu quả gây đáp ứng miễn dịch kháng protein p24 ở chuột

Kết quả kiểm tra kháng thể kháng protein p24 bằng phương pháp Western blot

Kết quả đánh giá khả năng gây đáp ứng miễn dịch của chuột với protein p24 bằng ELISA cho kết quả tốt. Tuy nhiên, chưa xác định chính xác rằng kháng thể do chuột tạo ra đặc hiệu cho vùng protein p24 hay protein LysSN-6His của protein p24 dung hợp. Phương pháp Western blot nhằm xác nhận lại chính xác kháng thể do chuột tạo ra chỉ kháng protein p24. Kết quả Hình 7 cho thấy xuất hiện vạch tín hiệu ở vị trí có kích thước khoảng 25 kDa đối với giếng chứa protein p24 chuẩn, so với chứng âm là chủng *B.*

subtilis 1012 có mang plasmid pHT01 không mang gene *lysSN-6his-gagp24* và plasmid pHT364b chỉ chứa gene *lysSN-6his* thì không xuất hiện vạch lai. Như vậy kháng thể thu nhận từ chuột bắt đặc hiệu với protein P24 chuẩn mà không bắt với protein LysSN-6His vì LysSN-6His là protein có nguồn gốc từ *Bacillus*, không gây độc với người và động vật, không gây đáp ứng miễn dịch trên người và chuột. Trong khi đó p24 là kháng nguyên đặc hiệu có tính gây đáp ứng miễn dịch cao nên chuột ưu tiên tạo kháng thể kháng lại kháng nguyên lạ này.



Hình 7. Kết quả Western blot xác nhận kháng thể chuột sinh ra đặc hiệu cho protein P24

M: thang chuẩn, pHT01: chủng B. subtilis 1012 mang plasmid pHT01 không mang gene lysSN-6his-gagp24, pHT364b: chủng B. subtilis 1012 mang plasmid pHT364b chỉ chứa gene lysSN-6his, P24 chuẩn: protein p24 chuẩn có nồng độ 6μg/μl.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tạo dòng thành công plasmid pHT1537 mang gene lysSN-6his-gagp24 cho phép biểu hiện protein P24 dung hợp ở chủng vi khuẩn *B. subtilis* 1012. Plasmid này cho phép biểu hiện protein p24 dung hợp khi được cảm ứng với IPTG. Thu nhận thành công protein p24 dung hợp với LysSN-6His và tạo được kháng thể chuột đặc hiệu cho protein kháng nguyên này. Kết quả này làm tiền đề cho định hướng nghiên cứu sản xuất vaccine cho virus HIV.

Lời cảm ơn: Chúng tôi chân thành cảm ơn giáo sư Luis Ferreira, Trường Đại Học São Paulo, Brazil đã cung cấp protein p24 chuẩn. Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát Triển Khoa Học Và Công Nghệ Quốc Gia (Nafosted) trong đề tài mã số 106-nn.02-2015.24 và đề tài cấp trường năm 2016 với mã số t2016-27.

Purification of p24 protein expressed in *Bacillus subtilis* and evaluation of its immunogenicity in mice

- Truong Thi Tinh Tuom
- Phan Thi PhuongTrang
- Nguyen Duc Hoang

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

p24 protein is a component of the HIV particle capsid. It plays an essential role in HIV to infect into the host cell and in the cycle life of virus. Therefore, this protein can be used in the orientative study “to create and produce HIV’s vaccine”. This study created the new *Bacillus subtilis* strain which expressed p24 protein. *B. subtilis* a safety and non-toxic bacteria strain for humans and animals, has system expression to allow over expression recombinant protein up to 10-30 % of total proteins.

Keywords: *Bacillus subtilis*, protein P24, pHT system, gene gagp2, HIV, LysSN
TÀI LIỆU THAM KHẢO

Plasmid pHT1537 was cloned successfully, containing lysSN-6his-gagp24 gene to encode p24 protein fused with LysSN protein and to allow the expression of p24 protein in *B. subtilis* by IPTG inducer. The target protein in the cell was checked by SDS-PAGE. The p24 fused protein was purified from His Trap column which contained Ni²⁺. Evaluation of the ability to produce antibody against p24 protein in mice by ELISA and Western blot was carried out.

- [1]. P.J. Bugelski, J.M. Kaplan, T.K. Hart, J. Miller, J.T. Laydon, J.C. Lee, G.B. Dreyer, R. Kirsh, Effect of a human immunodeficiency virus protease inhibitor on human monocyte function, *AIDS research and human retroviruses*, 8(12), 1951–1958 (1992).
- [2]. C.R. Harwood, *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses, *Trends in Biotechnology*, 10, 247–256 (1992).
- [3]. W.J. Lech, G. Wang, Y.L. Yang, Y. Chee, K. Dorman, D. McCrae, L.C. Lazzeroni, J.W. Erickson, J.S. Sinsheimer, A.H. Kaplan, *In vivo* sequence diversity of the protease of human immunodeficiency virus type 1: Presence of protease inhibitor-resistant variants in untreated subjects, *Journal of Virology*, 70(3), 2038–2043 (1996).
- [4]. T.Y. Li, N.Y. Jin, H.W. Wang, Z.R. Guo, H.H. Fang, R.G. An, Z. Yin, Expression and characterization of HIV-1 Gag p17-p24 protein”, *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao = Chinese Journal of Biotechnology*, 16, 1, 65–68 (2000).
- [5]. B. McRae, J.A. Lange, M.S. Ascher, F. de Wolf, H.W. Sheppard, J. Goudsmit, J.P. Allain, Immune response to HIV p24 core protein during the early phases of human immunodeficiency virus infection, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 7, 8, 637–643(1991).
- [6]. M. Nijhuis, et al., A novel substrate-based HIV-1 protease inhibitor drug resistance mechanism, *PLoS medicine*, 4, 1, e36 (2007).
- [7]. T.T.P. Phan, H.D. Nguyen, W. Schumann, Novel plasmid-based expression vectors for intra- and extracellular production of recombinant proteins

- in *Bacillus subtilis*, *Protein Expression and Purification*, 46, 2, 189–195 (2006).
- [8]. M. Schallmey, A. Singh, O.P. Ward, Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production, *Canadian Journal of Microbiology*, 50,1, 1–17 (2004).
- [9]. P.M. Sharp, B.H. Hahn, Origins of HIV and the AIDS pandemic, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), a006841 (2011).
- [10]. R.D. de Souza, M.T. Batista, W.B. Luiz, , R.C.M. Cavalcante, J.H. Amorim, R.S.P. Bizerra, E.G. Martins, L.C. de S. Ferreira, *Bacillus subtilis* spores as vaccine adjuvants: further insights into the mechanisms of action, *PloS One*, 9(1), e87454 (2014).