

EXPRESSION AND PURIFICATION OF GLYOXYLATE/HYDROXY PYRUVATE REDUCTASE FROM BACILLUS SUBTILIS

Nguyen Quyet Thang^{1*}, Doan Huu Thien¹, Duong Thi Cam Le¹, Pham Quang Minh¹,
Canh Huyen Trang¹, Dam Thi Lieu¹, Jin Kuk Yang²

¹National Institute for Control of Vaccine and Biologicals

²Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Soongsil University

Received on June 12th, 2022

Accepted on July 16th, 2022

Abstract

Background/Purpose: Gene expression refers to the process of translating genetic information from Deoxyribonucleic Acid (DNA) to Ribonucleic Acid (mRNA) of a “special” gene segment in a genome into a fully functional protein. Studying the function of a gene is an important and meaningful job to better understand each gene segment’s function. Glyoxylate/Hydroxypyruvate Reductase (GR/HPR) is a D-2-hydroxy-acid dehydrogenase related to renal failure. The expression and purification of this gene play a very important role in the research process, this is the first step to be able to conduct further studies on the function and dynamics of the gene or protein that this gene encodes. Driving opportunities for biotechnology uses in medicine development and medical treatment.

Methods: Described the experiments in the laboratory, gene transfer in bacteria, expression, and purification of protein.

Results: We successfully cloned and expressed the gene encoding glyoxylate/hydroxypyruvate dehydrogenase. The coding gene was inserted into the pET26b gene vector for the replicated purpose in the cell and to collect in large quantities. After that, the transgenic vector was inserted into the bacterial *E. coli* (DE3). Finally, from 2 liters of cell culture, we obtained 5 ml of recombinant protein solution concentration of 0.5mM (18.9 mg/ml).

Conclusion: We have successfully expressed the glyoxylate/hydroxypyruvate dehydrogenase genes from *Bacillus Subtilis* (BsGOR). As well as the process of expression and purification of this protein is also fully described in the study. Achieve the aim of research objectives.

Keywords: Glyoxylate/Hydroxy pyruvate Reductase; Recombinant protein, Expression, and Purifications

* Corresponding author
E-mail address: Thang50cnsh@gmail.com
<https://doi.org/10.56086/jcvb.v2i2.36>

BIỂU HIỆN VÀ TINH SẠCH ENZYME CHUYỂN HÓA GLYOXYLATE/ HYDROXYPYRUVATE TỪ CHỦNG VI KHUẨN BACILLUS SUBTILIS

Nguyễn Quyết Thắng^{1*}, Đoàn Hữu Thiên¹, Đường Thị Cẩm Lệ¹, Phạm Quang Minh¹,
Cảnh Huyền Trang¹, Đàm Thị Liễu¹, Jin Kuk Yang²

¹Viện kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế

²Khoa hóa học, Ngành khoa học tự nhiên, Trường Đại học Soongsil

Nhận ngày 12 tháng 6 năm 2022

Chấp nhận đăng ngày 16 tháng 7 năm 2022

Tóm tắt

Đặt vấn đề/ Mục tiêu: Biểu hiện gen/gene (Gene expression hay expression) là thuật ngữ dùng để chỉ quá trình chuyển đổi thông tin di truyền từ deoxyribonucleic acid (DNA) sang messenger ribonucleic acid (mRNA) của một đoạn gene “đặc biệt” trong một bộ gene (Genome) thành một protein có chức năng hoạt động hoàn chỉnh. Nghiên cứu chức năng hoạt động của một gene là một việc làm vô cùng quan trọng và ý nghĩa để chúng ta có thể hiểu hơn về chức năng của từng đoạn gene. Glyoxylate/Hydroxypyruvate enzyme (GR/HPR) là một enzyme thuộc nhóm D-2-hydroxy-acid dehydrogenase, có liên quan đến bệnh suy thận trên người. Việc biểu hiện và tinh sạch thành công gene này tạo nền móng cho những nghiên cứu sâu hơn về chức năng và động lực học của gene hay protein mà gene này mã hóa. Mở ra tiềm năng ứng dụng trong công nghệ sinh học để *điều chế thuốc và điều trị bệnh*.

Phương pháp: Mô tả thực nghiệm tại phòng thí nghiệm, chuyển gene trên tế bào Vi khuẩn, biểu hiện và tinh sạch protein.

Kết quả: Trình tự gene mã hóa cho enzyme có khả năng phân giải glyoxylate và hydroxypyruvate được chúng tôi nhân bản và biểu hiện thành công, sử dụng công nghệ chuyển gene trên tế bào Vi khuẩn. Gene mã hóa được chèn vào trong véc tơ chuyển gene pET26b để tiến hành nhân lên trong tế bào và được thu nhận với số lượng lớn. Véc tơ chuyển gene sau đó được chèn vào trong tế bào Vi khuẩn E. coli (DE3). Kết quả, từ 2 lít dung dịch tế bào chúng tôi thu được 5 ml dung dịch protein tái tổ hợp có nồng độ 0.5 mM (18.9 mg/ml).

Kết luận: Chúng tôi đã thành công trong việc biểu hiện gene mã hóa cho enzyme có khả năng phân giải glyoxylate và hydroxypyruvate từ chủng Vi khuẩn Bacillus subtilis (BsGOR). Cũng như quá trình biểu hiện và tinh sạch của protein này cũng được trình bày hoàn thiện trong nghiên cứu. Đạt mục tiêu nghiên cứu đã được đề ra.

Từ khóa: Glyoxylate/Hydroxy pyruvate Reductase; protein tái tổ hợp, biểu hiện và tinh sạch protein.

1. Đặt vấn đề

Enzyme chuyển hóa Glyoxylate mã

quốc tế (EC 1.1.1.26 or 1.1.1.79) có khả năng chuyển hóa glyoxylate tạo thành glycolate. Ngoài ra, quá trình chuyển hóa hydroxypyruvate thành D-glycerate cũng được cho là có mối liên hệ mật thiết với enzyme chuyển hóa hydroxypyruvate mã

* Tác giả liên hệ.

E-mail address: Thang50cnsh@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v2i2.36>

quốc tế (EC 1.1.1.81). Enzyme chuyển hóa glyoxylate/hydroxypyruvate (GR/HPR) được tìm thấy trong hầu hết trong các sinh vật bao gồm cả trên người và động vật bậc cao. Đã có rất nhiều nghiên cứu được công bố về biểu hiện và tinh sạch enzyme này từ nhiều nguồn khác nhau như cỏ khuẩn [1-3], vi khuẩn [4-6], nấm men [7], tảo [8], thực vật [9-11], nấm [12] và trên người [13, 14]. Enzyme glyoxylate là một trong những enzyme rất quan trọng trong quá trình chuyển hóa glyoxylate của các sinh vật. Trên thực vật, nó giúp cho cây khỏe mạnh, khử độc tế bào bằng cách làm giảm nồng độ glyoxylate trong tế bào [15]. Trên người, hGRHPR chuyển hóa glyoxylate thành glycolate, một chất ít hoạt động hơn [16]. Đột biến mất gen này trên người được cho là nguyên nhân chính dẫn đến suy thận loại II (hyperoxaluria type II). Bởi vì việc thiếu sự chuyển hóa của enzyme GRHPR dẫn đến tăng nồng độ oxalate trong nước tiểu và là nguyên nhân gây suy giảm chức năng thận dẫn đến suy thận [17, 18].

Nghiên cứu của chúng tôi là nghiên cứu đầu tiên sử dụng chủng *Bacillus subtilis* để biểu hiện và tinh sạch enzyme GRHPR. Đây là một chủng Vi khuẩn rất phổ biến, xuất hiện ở mọi nơi xung quanh chúng ta và đã được nghiên cứu, ứng dụng trong rất nhiều lĩnh vực khác nhau: công nghiệp, nông nghiệp, thực phẩm, dược [19]. Việc biểu hiện và tinh sạch thành công enzyme GRHPR từ gene đích được thể hiện thông qua kết quả của các thử nghiệm được trình bày trong nghiên cứu của chúng tôi.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu sử dụng cho quá trình tách và chuyển gene

Chủng Vi khuẩn *Bacillus Subtilis* được mua từ công ty ATCC (Mỹ) và gene

[A0A164TVM6] được sử dụng để làm DNA mẫu cho quá trình tách và nhân lên của gene. Sử dụng cặp Mồi (Primers) cho phản ứng PCR (Polymerase chain reaction) để khuếch đại gene “đích” với Mồi Xuôi: 5'-AGTTGGT CAT ATG AAA CCA TTT GTA TTT-3' và Mồi Ngược 5'-CTGTT CTC GAG TTG AAA TTC TCT TGT AAG-3'. Ngoài ra, cặp enzyme cắt giới hạn NdeI và XhoI được dùng để chèn gene đích vào véc tơ chuyển gene pET26b (Novagen, Mỹ). Véc tơ pET vector đã được đăng ký bản quyền tại Hàn Quốc (10-0690230). Chủng *Escherichia coli* (DE3) được sử dụng để biểu hiện gene. Cuối cùng, giải trình tự của gene đích được thực hiện bởi công ty Bionics, Hàn Quốc. Tất cả hóa chất chúng tôi sử dụng được mua từ Sigma- Aldrich (St .louis, MO, USA).

2.2. Phương pháp biểu hiện và tinh sạch enzyme *BsGOR*

Chủng Vi khuẩn *Escherichia coli* Rosetta2 (DE3) được sử dụng để làm tác nhân cho quá trình biểu hiện của véc tơ chuyển gene. Tế bào chứa vector chuyển gene được nuôi cấy bằng cách lắc qua đêm tại nhiệt độ 370C trong môi trường canh LB (Luria Broth) chứa 15 µg/ml kanamycin. Chuyển 10 ml môi trường nuôi cấy vào 1 lít môi trường LB chứa nồng độ kanamycin 15 µg/ml, lắc và nuôi cấy ở 370C. Khi giá trị OD 600 đạt từ 0.5 đến 0.8, tiến hành chuyển bình nuôi sang bể lạnh, làm lạnh nhanh bằng cách thêm đá vào bể và duy trì trong vòng 15 phút. Sau đó kích hoạt quá trình biểu hiện bằng cách bổ sung isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) vào trong bình nuôi, nồng độ cuối trong dung dịch là 0.25 mM, sau đó tiếp tục nuôi cấy tại 250C trong vòng 18 tiếng để quá trình biểu hiện gene được diễn ra. Cuối cùng, tế bào được thu nhận bằng cách ly tâm trong 30 phút tại

5,000 vòng/phút. Loại bỏ dịch nổi và thu tế bào bằng cách bổ sung dung dịch có thành phần 20 mM Tris-HCl, 5 % (v/v) glycerol, 0.1 mM TCEP, 100 mM NaCl, pH 8.0, 10mM imidazole và 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Sau đó tế bào được bảo quản tại -600C.

Quá trình ly giải protein từ tế bào được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống siêu âm phá vỡ tế bào, cài đặt chế độ phù hợp và giữ cho nhiệt độ của dung dịch tế bào không được vượt quá 150C. Dung dịch tế bào được phân tách bằng cách ly tâm tại 15000 vòng/ phút trong 1 giờ. Thu dịch nổi và tiến hành tinh sạch ngay lập tức.

Quá trình tinh sạch được thực hiện bằng cách lọc dịch nổi sau khi ly tâm bằng màng lọc 0.45 μm để loại bỏ các tạp chất hoặc các mảnh tế bào còn sót lại. Tiến hành tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực sử dụng His-trap (GE Healthcare Bioscience, USA), cân bằng cột bằng dung dịch dùng để bảo quản tế bào ở trên, sau đó sử dụng imidazole để thu nhận protein tái tổ hợp. Sản phẩm thu được ngay lập tức được cho sang cột Hi-Prep Desalting column (GE Healthcare Bioscience, USA) để loại bỏ imidazole tránh làm biến tính protein, và cuối cùng, sử dụng cột sắc ký kích thước size-exclusion chromatography column (Superdex-200; GE Healthcare Bioscience, USA) để phân tách và tinh sạch protein. Độ tinh sạch của enzyme được kiểm tra thông qua điện di SDS-PAGE và nồng độ protein thu được được đo bằng máy NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, USA), sản phẩm cuối cùng là protein đã tinh sạch được bảo quản tại -600C để dùng cho các thử nghiệm về sau.

2.3. Phân tích kích thước phân tử và hình dạng cấu trúc của protein tái tổ hợp của gene mã hóa cho enzyme BsGOR (Analytical size exclusion chromatography Multi-Angel Light Scattering -SEC-MALS)

Thử nghiệm được tiến hành trên hệ thống AKTA (GE Healthcare) kết hợp chung với hệ thống DAWN TREOS (Wyatt Technology). Cột sắc ký phân tích Superdex-200 HR 10/300 GL (GE Healthcare) với dung dịch đệm có thành phần bao gồm: 20 mM Tris-HCl, 200mM NaCl, pH 8.0, tốc độ chạy mẫu 0.5 ml/ phút. Nồng độ protein đầu vào 5.0 mg/mL. Đường chuẩn là hỗn hợp chứa thành phần của tám (08) loại protein khác nhau: aprotinin nguồn gốc từ phôi bò (Sigma-Aldrich, A3886), cytochrome C nguồn gốc từ tim ngựa (Sigma-Aldrich, C7150), carbonic anhydrase nguồn gốc từ huyết tương bò (Sigma-Aldrich, C7025), ovalbumin nguồn gốc từ lòng trắng trứng gà (Sigma-Aldrich, A8531), alcohol dehydrogenase có nguồn gốc từ nấm men (Sigma-Aldrich, A8656), β -amylase có nguồn gốc từ khoai lang (Sigma-Aldrich, A8781), và apoferritin có nguồn gốc từ lách ngựa (Sigma-Aldrich, A3630).

2.4. Thông tin về số hiệu trình tự của gene và trình tự acid amin sử dụng để giải trình tự gene

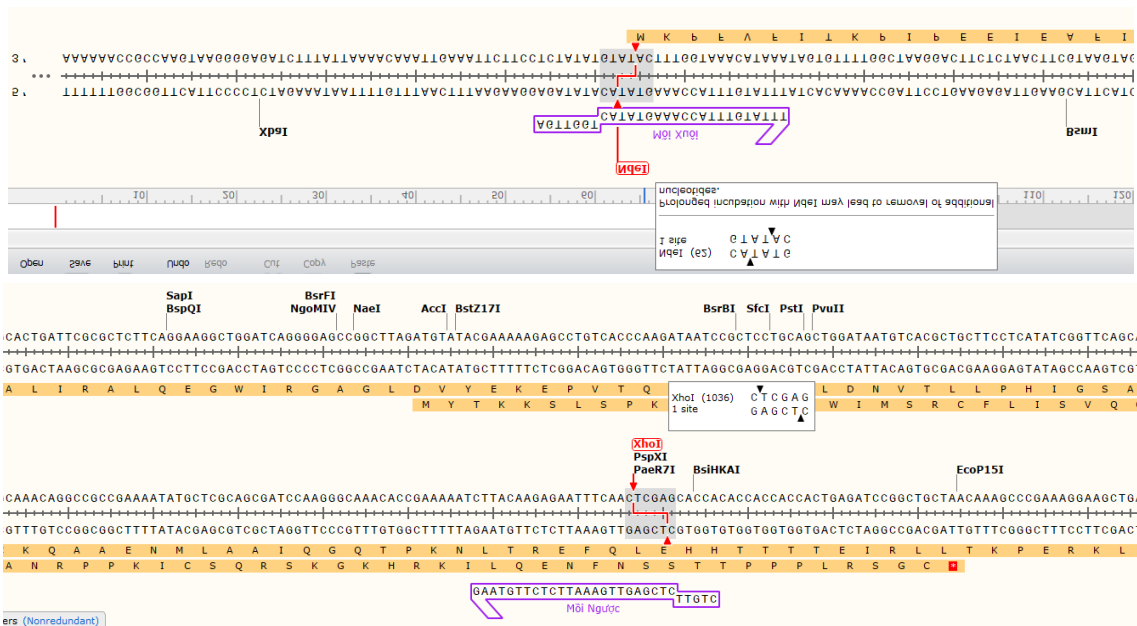
Thông tin về DNA được chúng tôi sử dụng lấy từ ngân hàng Gene “NCBI GenBank database” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). ID của BsGOR được trình bày trong báo cáo này là “KZD78503”. Thông tin về protein được chúng tôi sử dụng trong nghiên cứu được lấy từ nguồn UniProt database (<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A164TVM6>) với mã ký hiệu tra cứu là “A0A164TVM6”.

3. Kết quả

3.1. Biểu hiện gene

Cặp mồi được sử dụng đã được chúng tôi kiểm tra để tránh trường hợp các mồi bị bắt sai vị trí, tự bắt với nhau hoặc thiết kế không phù hợp với nhiệt độ của quá trình

PCR (hình 1). Thông qua bước kiểm tra, chúng ta có thể thấy cặp mồi Xuôi và Ngược được chúng tôi thiết kế có chiều dài phù hợp và nhiệt độ cũng như sự tương thích với gene “đích” cần được tách. Trình tự của enzyme cắt giới hạn NdeI và XhoI được chèn vào cũng được thể hiện rõ trong hình.



Hình 1: Trình tự mồi Xuôi và mồi Ngược

Để giải trình tự của gene mã hóa cho enzyme BsGOR được chúng tôi xác nhận thông qua giải trình tự bằng cả mồi xuôi và mồi ngược, sử dụng cặp mồi T7, kết quả được thể hiện rất rõ ràng trong Hình 2. Toàn bộ gene mã hóa cho enzyme được

chúng tôi tách và nhân lên thông qua hệ thống pET26b. Không xuất hiện bất kỳ đột biến hay mất đoạn. Trình tự của gene đích được giải mã hoàn toàn 100 % và tỷ lệ Gap hay xuất hiện đột biến thay thế cũng như mất đoạn là 0 % (Hình 2).

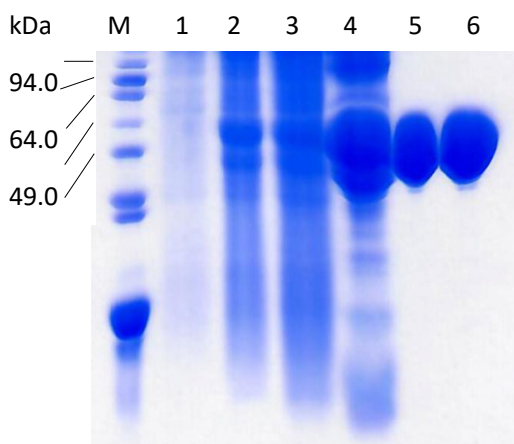
Sequences producing significant alignments									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168 chromosome complete genome	Bacillus subtili...	1794	1794	93%	0.0	100.00%	4316079	gi 1840169490 CP053102.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168 chromosome complete genome	Bacillus subtili...	1794	1794	93%	0.0	100.00%	4398844	gi 1837880844 CP052842.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus subtilis subsp. subtilis str. SMY chromosome complete genome	Bacillus subtili...	1794	1794	93%	0.0	100.00%	4212427	gi 1828308605 CP050532.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain 2014-3557 chromosome complete genome	Bacillus subtilis	1794	1794	93%	0.0	100.00%	4240660	gi 1799643101 CP045672.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain SRCM102750 chromosome complete genome	Bacillus subtilis	1794	1794	93%	0.0	100.00%	4098278	gi 1799485302 CP028215.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain GOT9 chromosome complete genome	Bacillus subtilis	1794	1794	93%	0.0	100.00%	4119195	gi 1796086223 CP047325.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain P9_B1 chromosome complete genome	Bacillus subtilis	1794	1794	93%	0.0	100.00%	4063468	gi 1775244673 CP045811.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain P8_B3 chromosome complete genome	Bacillus subtilis	1794	1794	93%	0.0	100.00%	4215511	gi 1775237401 CP045812.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain P8_B1 chromosome complete genome	Bacillus subtilis	1794	1794	93%	0.0	100.00%	4215512	gi 1775224065 CP045922.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain MB8_B7 chromosome complete genome	Bacillus subtilis	1794	1794	93%	0.0	100.00%	4191568	gi 1775162852 CP045821.1	

Hình 2: Kết quả Blast sau khi giải trình tự gene

Các kết quả khẳng định, mục tiêu tách và nhân bản gene mã hóa enzyme từ bộ gene của Vi khuẩn *Bacillus subtilis* đã thành công.

3.2. Biểu hiện gene và tinh sạch protein tái tổ hợp của enzyme BsGOR

Quá trình biểu hiện gene được thực hiện bằng cách nuôi cấy chủng DE3 đã được chèn plasmid chứa gene đích và nuôi trong môi trường LB tại nhiệt độ 25°C. Tại nhiệt độ này, protein được biểu hiện một cách từ từ và ổn định để có khả năng tinh sạch (Soluble). Vạch đại diện cho protein tái tổ hợp được thể hiện rõ nằm trong khoảng giữa vị trí của vạch chỉ thị 33.2 kDa và 41.7 kDa của thang protein chuẩn. Nó cũng phù hợp với thông tin tính toán của chúng tôi về kích thước phân tử của protein là 36.5 kDa. Thể tích nuôi cấy là 2 lít sử dụng phương pháp nuôi cấy đã được chúng tôi trình bày ở trên. Protein sau khi được tinh sạch đạt độ tinh khiết cao, được thể hiện thông qua việc so sánh lane 5 và 6 với các lane khác của kết quả điện di SDS-PAGE (hình 3). Protein sau đó được mang đi ly tâm lạnh để đưa về nồng độ 0.5 mM (nồng độ cuối là 18.9 mg/ml) và được bảo quản ở -60°C để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

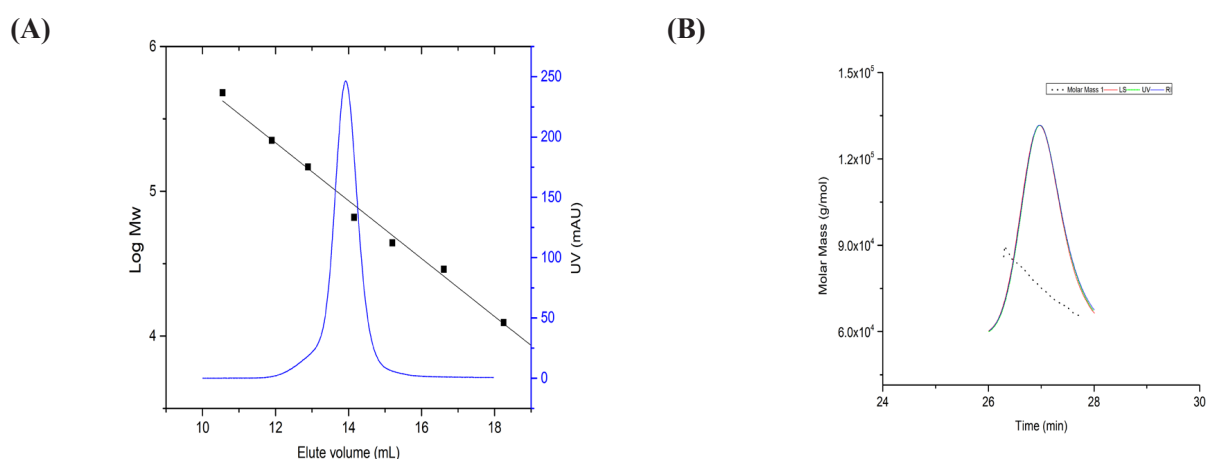


Hình 3. Tinh sạch protein tái tổ hợp BsGOR.

Với M: Chỉ thị protein. **1:** trước khi bổ sung IPTG. **2:** sau 18 tiếng bổ sung IPTG. **3:** Dung dịch nổi sau khi ly giải tế bào. **4:** dung dịch thu nhận sau khi sử dụng sắc ký ái lực His-Trap FF column. **5:** dung dịch thu được sau khi sử dụng sắc ký kích thước hạt Superdex-200 column. **6:** dung dịch protein được thu nhận và đem đi bảo quản.

3.3. Phân tích kích thước sử dụng sắc ký và kết quả phân tích của hệ thống Sec-MALS

Để có thể xác định được trạng thái cấu trúc của BsGOR, chúng tôi sử dụng hệ thống sắc ký phân tích kích thước. Dung dịch protein tái tổ hợp sau khi được tinh sạch và pha loãng đạt nồng độ (5.0 mg/ml) được cho chạy qua cột phân tích Superdex-200, thể tích của protein khi qua cột “V_c” được ghi nhận và so sánh với các protein chuẩn (Hình 4A). Giá trị V_c thu được là 13.92 ml. Từ kết quả trên ta có thể tính toán được, trọng lượng phân tử của protein tại điểm cực đại khi so sánh với protein chuẩn là xấp xỉ 70 kDa, tương ứng với khoảng gấp 2 lần trọng lượng phân tử của protein tái tổ hợp BsGOR được tính toán (36.5 kDa) cho từng đơn phân tử. Kết quả phân tích từ Sec-MALS được thể hiện qua hình 4B và bảng 1 cho kết quả, trọng lượng phân tử của mẫu là 75.51 kDa ($\pm 0.718\%$), chính xác gấp hai lần trọng lượng phân tử của từng đơn phân tử. Kết quả của hai phương pháp trên chứng minh được, protein tái tổ hợp BsGOR tồn tại ở dạng “hai phân tử” (homodimer) trong dung dịch. Những kết quả trên khi so sánh với các kết quả của protein tái tổ hợp trên người hGRHPR [13], nấm mốc [12], và các chủng vi khuẩn [4] khác là tương tự.



Hình 4. Trọng lượng phân tử của protein tái tổ hợp BsGOR bằng sắc ký phân tích. (A) Giá trị V_e và đường chuẩn protein của phương pháp sắc ký phân tích. (B) Kết quả phân tích SEC-MALS. Tám loại protein chuẩn khác nhau được sử dụng làm đường chuẩn, apoferritin có kích thước phân tử 474 kDa (Elute volume \sim 20 mL) không được thể hiện trên hình. Chi tiết được mô tả ở phần vật liệu và phương pháp nghiên cứu. Giá trị của đỉnh peak V_e là 13.92 mL.

Mass Fraction (%)	100%
Mn (g/mol)	7.511×10^4 ($\pm 0.712\%$)
Mp (g/mol)	7.604×10^4 ($\pm 0.212\%$)
Mw (g/mol)	7.551×10^4 ($\pm 0.718\%$)
Mz (g/mol)	7.592×10^4 ($\pm 1.616\%$)
Mw/Mn	1.005 ($\pm 1.011\%$)
Mz/Mn	1.011 ($\pm 1.766\%$)

Bảng 1: Kết quả phân tích Sec-MALS

4. Bàn luận

Gene đích mã hóa cho enzyme có khả năng phân giải Glyoxylate/Hydroxypyruvate từ chủng Vi khuẩn *Bacillus subtilis* (BsGOR) được chúng tôi phân tách thành công thông qua kết quả của giải trình tự gene. Gene BsGOR sau đó được chuyển vào trong véc tơ chuyển gene pET26b và được biểu hiện cũng như tinh sạch thành công thông qua các kết quả của điện di SDS-PAGE và sắc ký phân tích khối lượng. Sau quá trình tinh sạch, thu nhận được protein tái tổ hợp của enzyme BsGOR có nồng độ 0.5 mM (18.9 mg/ml)

với độ tinh sạch cao và protein tái tổ hợp vẫn ổn định ở nồng độ này, không bị biến tính cũng như thay đổi cấu trúc không gian qua kết quả phân tích Sec-MALS. Dạng tồn tại của protein tái tổ hợp trong dung dịch là dạng đa phân tử (homodimer) tương tự so với protein tái tổ hợp được thu nhận từ các nguồn khác. Điều đó chứng tỏ được chúng tôi đã biểu hiện và tinh sạch thành công gene đích mã hóa cho enzyme có khả năng phân giải Glyoxylate/Hydroxypyruvate từ chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis*, kết quả của nghiên cứu này có thể được tiếp tục phát triển và nghiên cứu một cách chi

tiết hơn về hoạt tính enzyme cũng như cấu trúc và chức năng hoạt động của enzyme BsGOR.

5. Kết luận

Nhóm nghiên cứu đã thành công biểu hiện được enzyme có khả năng chuyển hóa GRHPR từ bộ gene của chủng Vi khuẩn *Bacillus subtilis*. Quá trình tách gene, chuyển gene và biểu hiện gene được thực hiện thành công và trình bày thông qua các kết quả chi tiết trong nghiên cứu của chúng tôi. Đáp ứng được mục tiêu của nghiên cứu đã được đặt ra.

References

[1] Ohshima, T., et al., A novel hyperthermophilic archaeal glyoxylate reductase from *Thermococcus litoralis*. Characterization, gene cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 2001. 268(17): p. 4740-7.

[2] Yoshikawa, S., et al., Structure of archaeal glyoxylate reductase from *Pyrococcus horikoshii* OT3 complexed with nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2007. 63(Pt 3): p. 357-65.

[3] Lassalle, L., et al., New insights into the mechanism of substrates trafficking in Glyoxylate/Hydroxypyruvate reductases. *Sci Rep*, 2016. 6: p.20629.

[4] Fauvart, M., et al., Identification of a novel glyoxylate reductase supports phylogeny-based enzymatic substrate specificity prediction. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1774(9): p. 1092-8.

[5] Nunez, M.F., et al., Biochemical characterization of the 2-ketoacid reductases encoded by *yedW* and *yiaE* genes in *Escherichia coli*. *Biochem J*, 2001. 354(Pt 3): p. 707-15.

[6] Izumi, Y., et al., Purification and characterization of hydroxypyruvate reductase from

a serine-producing methylotroph, *Hyphomicrobium methylovorum* GM2. *Eur J Biochem*, 1990. 190(2): p. 279-84.

[7] Rintala, E., et al., The ORF YNL274c (GOR1) codes for glyoxylate reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2007. 24(2): p. 129-36.

[8] Yokota, A., S. Haga, and S. Kitaoka, Purification and some properties of glyoxylate reductase (NADP+) and its functional location in mitochondria in *Euglena gracilis* z. *Biochem J*, 1985. 227(1): p. 211-6.

[9] Kleczkowski, L.A., D.D. Randall, and D.G. Blevins, Purification and characterization of a novel NADPH(NADH)-dependent glyoxylate reductase from spinach leaves. Comparison of immunological properties of leaf glyoxylate reductase and hydroxypyruvate reductase. *Biochem J*, 1986. 239(3): p. 653-9.

[10] Zelitch, I., The isolation and action of crystalline glyoxylic acid reductase from tobacco leaves. *J Biol Chem*, 1955. 216(2): p. 553-75.

[11] Greenler, J.M., et al., Isolation, characterization and sequence analysis of a full-length cDNA clone encoding NADH-dependent hydroxypyruvate reductase from cucumber. *Plant Mol Biol*, 1989. 13(2): p. 139-50.

[12] Duan, X., et al., Characterization and crystal structure of a first fungal glyoxylate reductase from *Paecilomyces thermophila*. *Enzyme Microb Technol*, 2014. 60: p. 72-9.

[13] Booth, M.P., et al., Structural basis of substrate specificity in human glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase. *J Mol Biol*, 2006. 360(1): p. 178-89.

[14] Rumsby, G. and D.P. Cregeen, Identification and expression of a cDNA for human hydroxypyruvate/glyoxylate reductase. *Biochim Biophys Acta*, 1999. 1446(3): p. 383-8.

[15] Allan, W.L., et al., Role of plant glyoxylate reductases during stress: a hypothesis. *Biochem J*, 2009. 423(1): p. 15-22.

- [16] Mdluli, K., et al., A preliminary account of the properties of recombinant human Glyoxylate reductase (GRHPR), LDHA and LDHB with glyoxylate, and their potential roles in its metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 2005. 1753(2): p. 209-16.
- [17] Cregeen, D.P., et al., Molecular analysis of the glyoxylate reductase (GRHPR) gene and description of mutations underlying primary hyperoxaluria type 2. *Hum Mutat*, 2003. 22(6): p. 497.
- [18] Hoppe, B., An update on primary hyperoxaluria. *Nat Rev Nephrol*, 2012. 8(8): p. 467-75.
- [19] Su, Y., et al., *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials, and medicine. *Microb Cell Fact*, 2020. 19(1): p. 173.