



## Bài báo nghiên cứu

# DIMER HÓA PROTEIN DUNG HỢP VỚI RHAU BỞI G-QUADRUPLEX CÓ CẤU TRÚC SONG SONG

Trương Thị Tinh Tuom<sup>1</sup>, Nguyễn Đắc Nguyễn Phúc<sup>2</sup>,

Phan Hùng Việt<sup>3</sup>, Đặng Thanh Dũng<sup>3</sup>, Phan Thị Phương Trang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>2</sup>Cranbrook Schools, USA

<sup>3</sup>Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

\*Tác giả liên hệ: Phan Thị Phương Trang – Email: [ptptrang@hcmus.edu.vn](mailto:ptptrang@hcmus.edu.vn)

Ngày nhận bài: 18-3-2021; ngày nhận bài sửa: 25-3-2021, ngày chấp nhận đăng: 30-3-2021

## TÓM TẮT

Protein dimer có vai trò quan trọng trong hoạt động sống của tế bào như hoạt hóa enzyme, truyền tín hiệu qua các thụ thể và điều hòa biểu hiện gen. Các phương pháp dimer hóa protein bởi các phân tử trung gian ra đời nhằm giúp con người chủ động trong việc điều hòa các quá trình sinh học. G-quadruplex là một phân tử có tiềm năng dimer hóa protein thông qua liên kết đặc hiệu với 2 phân tử RHAU (RNA helicase liên kết với vùng trình tự giàu adenine và uracil). Tuy nhiên đến nay, chức năng này của G-quadruplex vẫn chưa được nghiên cứu rộng rãi. Trong nghiên cứu dưới đây, chúng tôi đã dòng hóa vector pTD14 mang gen mã hóa YFP dung hợp với peptide RHAU và biểu hiện, tinh chế protein RHAU-YFP. Sự dimer hóa hai protein RHAU-YFP và RHAU-CFP thông qua G-quadruplex được kiểm tra bằng phản ứng FRET. Kết quả cho thấy, vector pTD14 đã được dòng hóa thành công có thể được biểu hiện tạo protein RHAU-YFP trong điều kiện nhiệt độ 16°C, nồng độ IPTG 0,05 mM trong 24 giờ. Protein RHAU-YFP được tinh chế một lần qua cột His-Trap. Phản ứng FRET cho thấy G-quadruplex có khả năng dimer hóa protein RHAU-YFP và RHAU-CFP trong điều kiện thí nghiệm và nồng độ G-quadruplex 500 μM cho khả năng dimer hóa cao nhất. Các kết quả trên là tiền đề cho việc ứng dụng G-quadruplex để điều hòa các quá trình sinh học trong nghiên cứu y dược, bảo vệ sức khỏe con người.

**Từ khóa:** CFP; dimer hóa, FRET; G-quadruplex; RHAU; YFP

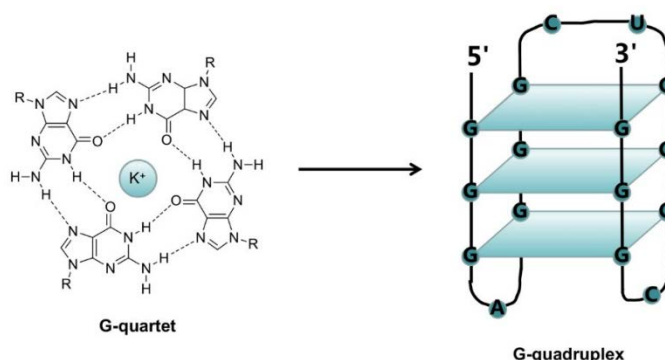
## 1. Đặt vấn đề

Sự dimer hóa protein là một quá trình sinh học rất quan trọng vì khi hình thành cấu trúc dimer hoặc oligomer, protein sẽ được hoạt hóa và có chức năng (Marianayagam, Sunde, & Matthews, 2004) như hoạt hóa enzyme (Renatus, Stennicke, Scott, Liddington, & Salvesen, 2001), truyền tín hiệu qua các thụ thể (Gomes et al., 2001) và điều hòa biểu hiện

---

*Cite this article as:* Trương Thị Tinh Tuom, Nguyễn Đắc Nguyễn Phúc, Phan Hùng Việt, Đặng Thanh Dũng, & Phan Thị Phương Trang (2021). Dimerization of RHAU-fused proteins by parallel G-quadruplex. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 18(3), 548-558.

gen (Matthews, & Visvader, 2003). Việc kiểm soát sự dimer hóa protein được ứng dụng trong điều hòa các quá trình sinh học và đáng chú ý là sử dụng trong liệu pháp tế bào (Hill, Martinko, Nguyen, & Wells, 2018). Vì thế, nhiều phân tử nhỏ cảm ứng sự dimer hóa protein đã được các nhà khoa học nghiên cứu như rapamycin (Spencer, Wandless, Schreiber, & Crabtree, 1993), TMP-Htag (Ballister, Aonbangkhen, Mayo, Lampson, & Chenoweth, 2014), ABT-737 (Hill et al., 2018) và cucurbit[8]uril (Dang, Nguyen, Merckx, & Brunsveld, 2013). Tuy nhiên, các phân tử này còn nhiều nhược điểm như rapamycin gây độc cho tế bào người (Inobe, & Nukina, 2016) hay cucurbit[8]uril sử dụng protein domain là những peptide khó đưa vào trong tế bào. Trong khi đó, G-quadruplex (những trình tự DNA hoặc RNA giàu guanine gấp cuộn tạo thành cấu trúc 4 sợi bao gồm các G-tetrad xếp chồng lên nhau trong môi trường hiện diện  $K^+$  hay  $Na^+$  (Gellert, Lipsett, & Davies, 1962)) (Hình 1) nổi lên như một phân tử tiềm năng trong dimer hóa protein do có nhiều thế mạnh như dễ đưa vào trong tế bào, là cấu trúc tự nhiên trong các tế bào eukaryote, dễ dàng được tổng hợp và thu nhận nhờ các kỹ thuật sinh học phân tử. Bên cạnh đó, G-quadruplex đã được chứng minh có thể liên kết đặc hiệu với protein RHAU (RNA Helicase associated with AU-rich element) tại 13 amino acid bảo tồn gọi là RSM (RHAU specific motif) (Lattmann, Giri, Vaughn, Akman, & Nagamine, 2010). Như vậy, có thể ứng dụng sự tương tác đặc hiệu giữa G-quadruplex và RHAU để hình thành sự dimer hóa của các protein bằng cách dung hợp RHAU với các protein quan tâm, sau đó sẽ tiến hành sự dimer hóa các protein dung hợp bằng G-quadruplex. Để phát hiện có sự dimer hóa protein của hệ thống G-quadruplex – RHAU thì phương pháp FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer-Truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang) có thể được sử dụng với cặp protein phát huỳnh quang CFP (Cyan Fluorescent Protein – phát màu xanh) và YFP (Yellow Fluorescent Protein – phát màu vàng). Đây là hai protein dễ biểu hiện, bền và quan trọng là có sự chồng lấp giữa quang phổ phát ra của CFP với quang phổ hấp thụ của YFP nên phù hợp với phương pháp FRET (Bajar, Wang, Zhang, Lin, & Chu, 2016). Cụ thể, khi kích thích CFP ở bước sóng 420 nm, nếu không có sự dimer (khoảng cách giữa CFP và YFP lớn hơn 10 nm) thì CFP sẽ không truyền năng lượng cho YFP mà dùng năng lượng đó để phát quang với peak 475 nm. Ngược lại, nếu sự dimer xảy ra (khoảng cách giữa CFP và YFP từ 1 tới 10 nm), CFP sẽ truyền bớt năng lượng cho YFP, kết quả là làm giảm cường độ phát quang của CFP ở peak 475 nm và làm YFP phát quang với peak 525 nm. Trên thực tế, sử dụng phương pháp trên, nhóm tác giả đã chứng minh hiệu quả của sự dimer hóa protein liên kết peptide RHAU cấu thành từ 30 amino acid thông qua G-quadruplex TERRA (Truong, 2020). Trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu khả năng dimer hóa protein liên kết với peptide RHAU có kích thước lớn hơn (53 amino acid) của cấu trúc G-quadruplex T95-2T nhằm đa dạng hóa các lựa chọn phục vụ cho các nghiên cứu trên tế bào trong tương lai.



Hình 1. Cấu trúc G-quadruplex (Sun, Wang, Cheng, Su, & Ou, 2019)

## 2. Vật liệu và phương pháp

### 2.1. Dòng hóa tạo vector pTD14 mang gen YFP

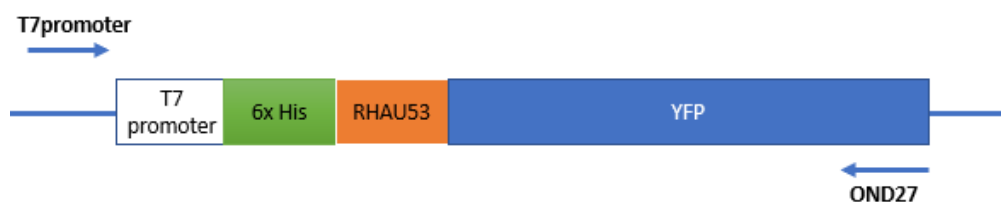
Thu nhận gen *yfp* mã hóa cho protein YFP bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu OND26 và OND27 trên khuôn plasmid pD36 (Trung tâm Khoa học và Công nghệ sinh học). Plasmid khung pTD1 (Trung tâm Khoa học và Công nghệ sinh học) và sản phẩm PCR thu gen *yfp* được xử lý bằng enzyme cắt giới hạn *Bgl*III và *Xho*I (New England Biolab). Sản phẩm cắt được nối với nhau bằng enzyme T4 DNA ligase (Thermo Scientific) tạo ra plasmid tái tổ hợp pTD14.

Plasmid khung pTD1 có các đặc điểm: mang gen *RHAU* mã hóa cho peptide RHAU (53 amino acid) (Hình 2); có promoter T7 biểu hiện mạnh; chứa đuôi 6x histidine giúp cho việc tinh chế protein và gen kháng kháng sinh ampicillin hỗ trợ cho việc sàng lọc.

5' CATCCCGGGCACCTGAAAGGCCGCGAAATCGGCATGTGGTACGCGAAAA  
AACAGGGGCAGAAGAACAAGGAAGCGGAGAGGCAAGAGAGAGCTGTAGTA  
CACATGGATGAACGACGAGAAGAACAATTGTACAGTTACTGAATTCTGTTC  
AAGCGAAG 3'

Hình 2. Trình tự nucleotide của gen RHAU

Sản phẩm nối được hóa biến nạp vào *E. coli* OmniMAX™ (Invitrogen), sàng lọc thể biến nạp có mang plasmid bằng môi trường chọn lọc Luria-Bertani có chứa kháng sinh ampicillin với nồng độ cuối 100 µg/ml (LB-Amp). Các thể biến nạp mọc trên môi trường chọn lọc kháng sinh được kiểm tra lại bằng phương pháp PCR khuẩn lạc với 2 mồi T7promoter và OND27. Sơ đồ vị trí bắt cặp của mồi trong phản ứng trên được thể hiện trong Hình 3. Các khuẩn lạc cho kết quả PCR khuẩn lạc dương tính được tiến hành tách chiết plasmid và kiểm tra trình tự bằng cách giải trình tự tại Công ty MacroGen Inc bằng mồi T7promoter (Bảng 1).



**Hình 3.** Sơ đồ vị trí bắt cặp môi cho phản ứng PCR khuẩn lạc

**Bảng 1.** Trình tự các đoạn oligonucleotide

(thiết kế bằng phần mềm CloneManager 9 và tổng hợp bởi Macrogen Inc)

Tên primer	Trình tự (5' – 3')	Mục đích
RNA T95-2T	GGGUGGGUGGGUGGG	Tạo ra cấu trúc G-quadruplex
OND26	TGCGAGATCTGGCGGCGGCAGCATGGTGAG	Thu gen <i>yfp</i>
OND27	CAGACTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATG	Thu gen <i>yfp</i> và PCR khuẩn lạc

### 2.2. Biểu hiện protein RHAU-YFP trong *E. coli* BL21(DE3)

Plasmid pTD14 được hóa biến nạp vào *E. coli* BL21(DE3) (Invitrogen). Nhằm tối ưu hóa nồng độ IPTG đạt mức biểu hiện cao nhất và thu được protein mục tiêu gấp cuộn đúng, tiến hành nuôi cấy hoạt hóa các khuẩn lạc trong môi trường lỏng ở 37°C qua đêm, tiến hành nuôi cấy cảm ứng để kiểm tra biểu hiện của protein mục tiêu ở các nồng độ IPTG khác nhau (0; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 0,75; 1 mM) khi OD<sub>600</sub> đạt 0,8 ở nhiệt độ 16°C trong 24 giờ. Đánh giá mức độ biểu hiện protein mục tiêu bằng phương pháp SDS-PAGE.

### 2.3. Tinh chế protein RHAU-YFP

Chủng *E. coli* BL21(DE3) mang plasmid pTD14 được nuôi cấy, cảm ứng biểu hiện trong 1,4 lít môi trường LB-Amp với điều kiện nhiệt độ và nồng độ IPTG đã khảo sát trên. Thu nhận sinh khối tế bào bằng cách li tâm 6000 rcf/phút trong 10 phút ở 4°C, huyền phù sinh khối trong dung dịch đệm chứa 30 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM NaCl; 5% glycerol, DNase I 20 µg/ml, và PMSF 1 mM. Phá tế bào bằng sóng siêu âm (biên độ 70 amplitude trong 10 giây, nghỉ 30 giây), li tâm 19.000 rcf/phút trong 30 phút ở 4°C, thu nhận dịch nổi có chứa protein. Tinh chế protein bằng phương pháp sắc kí ái lực với cột HisTrap HP (GE Healthcare) theo nguyên tắc các protein mục tiêu có chứa đuôi histidine sẽ bám vào cột nhờ liên kết giữa histidine và Ni<sup>2+</sup> trong cột. Imidazole là chất có ái lực cao với Ni<sup>2+</sup> được sử dụng làm chất cạnh tranh giúp dung li protein mục tiêu ra khỏi cột HisTrap. Nồng độ imidazole sử dụng tăng dần 10 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM, 120 mM, 160 mM.

### 2.4. Kiểm tra sự dimer của protein RHAU-CFP và RHAU-YFP bởi G-quadruplex

Protein RHAU-YFP sau khi được tinh chế, tiến hành kiểm tra sự dimer hóa của protein này với protein RHAU-CFP (33,2 kDa, nhận tại 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) dưới sự hiện diện của cấu trúc RNA G-quadruplex (Bảng 1) thông qua các mẫu thí nghiệm có

thành phần như trong Bảng 2. Nồng độ các protein được sử dụng trong phản ứng dimer là 2  $\mu$ M, G-quadruplex (nếu có) là 1  $\mu$ M và tổng thể tích mỗi phản ứng là 50  $\mu$ l. Dung dịch phản ứng FRET chứa 20 mM potassium phosphate pH 6,5. Tín hiệu FRET thể hiện sự dimer hóa được đọc bởi máy đọc đĩa CLARIOstar (BMG LabTech) dựa trên nguyên tắc kích thích CFP ở bước sóng 420 nm và đo cường độ của các bước sóng phát ra từ 430 nm tới 600 nm. Đồ thị quang phổ ở mỗi protein sẽ được vẽ ra, tính tỉ lệ FRET (525 nm/475 nm) để đánh giá sự dimer và so sánh khả năng dimer giữa các cấu trúc G-quadruplex khác nhau.

**Bảng 2.** Các bố trí thí nghiệm trong kiểm tra FRET

	Thành phần	Mục đích
	CFP + RHAU-YFP + Có G-quadruplex	
<b>Mẫu đối chứng</b>	CFP + RHAU-YFP + Không G-quadruplex	Kiểm tra xem sự dimer có phải do tương tác giữa G-quadruplex và RHAU hay không
	RHAU-CFP + RHAU-YFP + Không G-quadruplex	
<b>Mẫu thí nghiệm</b>	RHAU-CFP+ RHAU-YFP + Có G-quadruplex	Kiểm tra sự dimer của RHAU-CFP và RHAU-YFP thông qua G-quadruplex

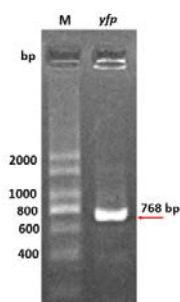
**2.5. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ G-quadruplex lên sự dimer hóa của protein RHAU dung hợp**

Để kiểm tra ảnh hưởng của nồng độ G-quadruplex đến việc dimer hóa protein và tìm ra nồng độ dimer hóa tốt nhất, tiến hành khảo sát các nồng độ G-quadruplex tăng dần: 0; 10; 100; 250; 500; 1000; 3000  $\mu$ M trong phản ứng FRET với các các thông số khác như đã mô tả mục 2.4. So sánh tỉ lệ cường độ bước sóng (525 nm/475 nm).

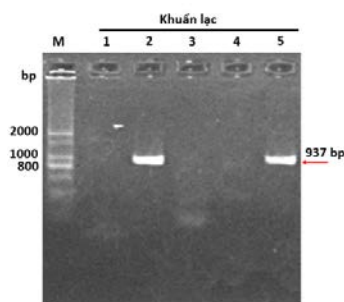
**3. Kết quả và thảo luận**

**3.1. Tạo plasmid pTD14 chứa gen YFP**

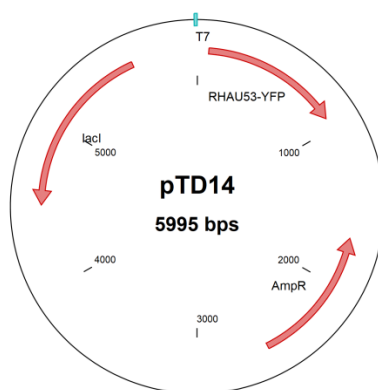
Gen *yfp* được thu nhận từ phản ứng PCR với cặp mồi OND26 và OND27 thu được gen mục tiêu có kích thước 768 bp, kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR thu gen *yfp* được thể hiện ở Hình 4. Kết quả điện di cho thấy có sự xuất hiện một vạch duy nhất tương ứng với kích thước lí thuyết khi so với thang chuẩn, chứng tỏ gen *yfp* được thu nhận thành công. Sản phẩm nối giữa gen mục tiêu và plasmid pTD1 đã được xử lí với 2 enzyme cắt giới hạn là *Bgl*III và *Xho*I được biến nạp vào chủng *E. coli* OmniMAX, chọn 5 khuẩn lạc mọc được trên môi trường chứa kháng sinh ampicillin tiến hành kiểm tra sự tái tổ hợp gen mục tiêu bằng PCR khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu T7promoter và OND27. Kết quả PCR khuẩn lạc cho thấy có 2 trong 5 khuẩn lạc xuất hiện vạch sáng tương ứng với kích thước lí thuyết của vùng gen khuếch đại là 937 bp (Hình 5). Khuẩn lạc số 2 được nuôi cấy, tách chiết plasmid và giải trình tự. Kết quả giải trình tự từ Công ti MacroGen (Hàn Quốc) sau khi so sánh với trình tự lí thuyết cho thấy có sự tương đồng 100%. Như vậy, plasmid tái tổ hợp pTD14 đã được dòng hóa thành công (Hình 6).



**Hình 4.** Kết quả điện di sản phẩm PCR thu gen YFP  
M: Thang DNA; yfp: Sản phẩm PCR thu gen YFP



**Hình 5.** Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc  
M: Thang DNA; 1-5: Sản phẩm PCR các khuẩn lạc 1 - 5



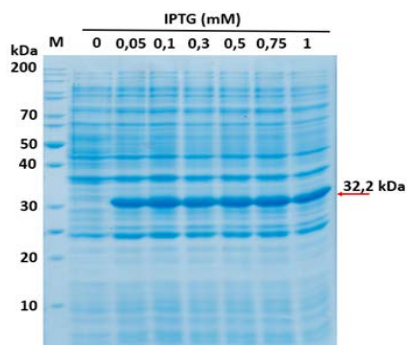
**Hình 6.** Sơ đồ vector pTD14

### 3.2. Khảo sát nồng độ IPTG thích hợp cho sự biểu hiện của protein RHAU-YFP

Chủng *E. coli* BL21(DE3) mang plasmid pTD14 được nuôi cấy cảm ứng biểu hiện protein ở các nồng độ IPTG 0; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 0,75; 1 mM, ở nhiệt độ 16°C và trong 24 giờ. Mức độ biểu hiện protein mục tiêu được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE (Hình 7). So với giếng đối chứng (0 mM IPTG), các giếng có nồng độ IPTG từ 0,05 đến 1 mM đều xuất hiện các vạch protein có độ đậm tương đương nhau với kích thước tương ứng với lí thuyết của protein RHAU-YFP là 32,2 kDa. Do vậy, nồng độ IPTG 0,05 mM được chọn để cảm ứng biểu hiện protein với dung tích lớn phục vụ cho việc tinh chế protein.

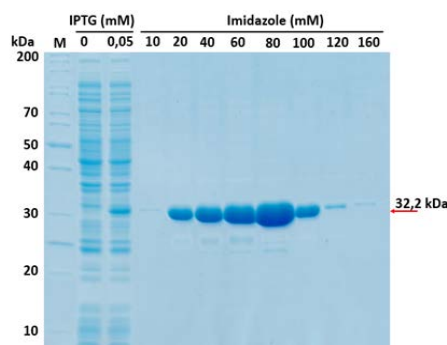
### 3.3. Tinh chế protein RHAU-YFP

Chủng *E. coli* BL21(DE3) mang vector pTD14 sau khi khảo sát được nuôi cấy biểu hiện ở thể tích lớn. Protein mục tiêu được tinh chế bằng cột HisTrap HP (GE Healthcare) và dung ly bằng imidazole có nồng độ tăng dần. Kết quả SDS-PAGE tinh chế protein RHAU-YFP được trình bày trong Hình 8 cho thấy mẫu sau cảm ứng IPTG xuất hiện vạch protein đậm tương ứng với kích thước lí thuyết của RHAU-YFP là 32,2 kDa chứng tỏ đã có sự biểu hiện protein mục tiêu. Ở các phân đoạn dung ly từ 20 mM đến 100 mM imidazole, vạch protein mục tiêu đậm dần cho thấy protein được đẩy ra khỏi cột do Ni<sup>2+</sup> cạnh tranh với His-tag của RHAU-YFP. Các phân đoạn dung ly từ 20 mM đến 100 mM imidazole được thu nhận, loại bỏ các chất như imidazole và muối bằng phương pháp thẩm tích nhằm chuẩn bị cho các phản ứng dimer hóa.



**Hình 7.** Kết quả khảo sát nồng độ IPTG ảnh hưởng lên sự biểu hiện RHAU-YFP

M: Thang protein; 0; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 0,75; 1: Protein từ tế bào được nuôi cấy cảm ứng bởi 0; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 0,75; 1 mM IPTG tương ứng.



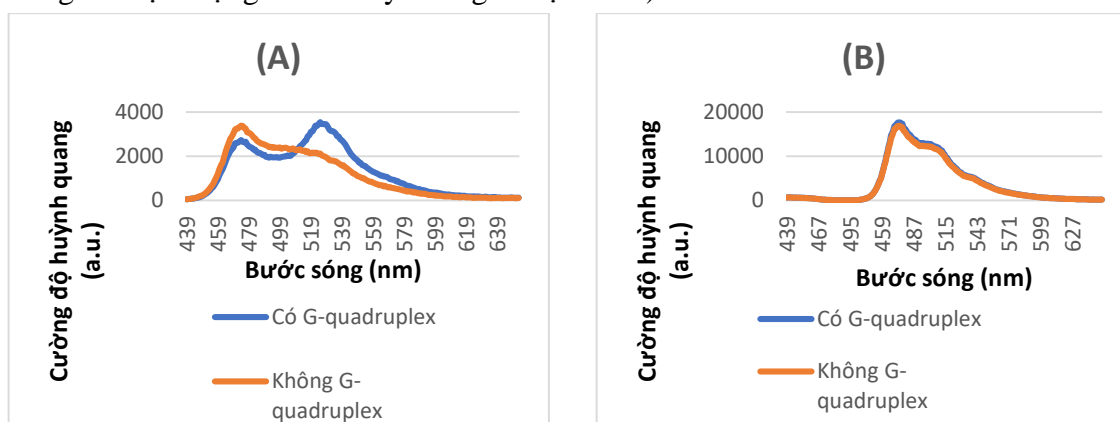
**Hình 8.** Kết quả tinh chế protein RHAU-YFP

M: Thang protein; 0: Mẫu đối chứng (-) không có IPTG; 0,05: Protein tổng số trước khi nạp cột từ tế bào nuôi cấy cảm ứng 0,05 mM IPTG; 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 160: dịch dung li protein ở các phân đoạn 10 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM, 120 mM, 160 mM imidazole tương ứng

### 3.4. Kiểm tra sự dimer của protein RHAU-CFP và RHAU-YFP bằng G-quadruplex

RHAU-YFP tinh sạch được cho phản ứng dimer với protein RHAU-CFP được cung cấp bởi Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học dưới xúc tác của G-quadruplex. Sự dimer protein được kiểm tra bằng phương pháp FRET. Quang phổ phát quang ở mỗi mẫu sau khi bị kích thích ở bước sóng 420 nm được ghi nhận và thể hiện thành sơ đồ trên Hình 9. Trong đó, kết quả Hình 9 (A) cho thấy cường độ huỳnh quang tại bước sóng 475 nm của CFP giảm và cường độ huỳnh quang của YFP tại bước sóng 525 nm tăng do hiện tượng FRET so với khi không có G-quadruplex. Do CFP và YFP nằm đủ gần nên năng lượng từ CFP truyền qua YFP làm giảm cường độ phát quang của CFP và tăng cường độ phát quang của YFP, chứng tỏ cấu trúc G-quadruplex đã dimer hóa thành công hai protein này.

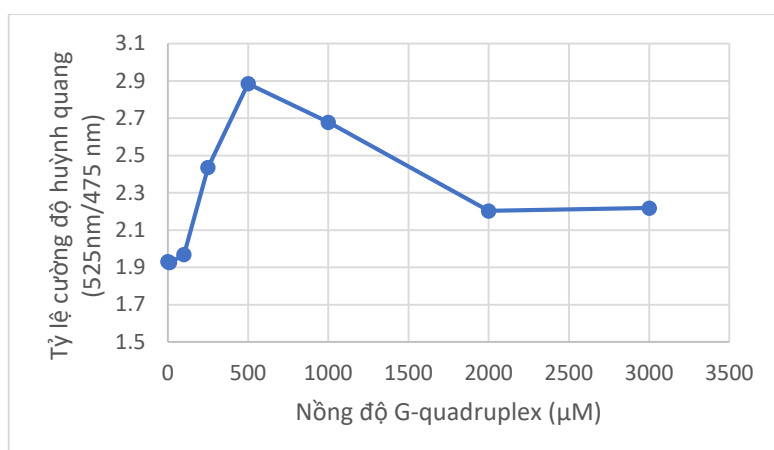
Ngoài ra, các kết quả trong Hình 9 (B) đã chứng minh sự dimer này là do tương tác giữa G-quadruplex với hai protein RHAU mà không phải do tương tác khác: quang phổ của hỗn hợp 2 protein CFP và RHAU-YFP khi có và không có G-quadruplex như nhau (không có hiện tượng FRET hay không có sự dimer).



**Hình 9.** Kết quả quang phổ kiểm tra sự dimer bằng phương pháp FRET  
(A) Mẫu RHAU-CFP + RHAU-YFP khi có và không có G-quadruplex;  
(B) Mẫu CFP + RHAU-YFP khi có và không có G-quadruplex.

### 3.5. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ G-quadruplex đến sự dimer của protein RHAU53-CFP và RHAU53-YFP

Lượng protein dimer được tạo ra nhiều khi cường độ huỳnh quang tại bước sóng 475 nm càng giảm và 525 nm càng tăng (tỉ lệ cường độ huỳnh quang 525 nm/475 nm càng lớn). Tỉ lệ cường độ huỳnh quang (525 nm/475 nm) ở các nồng độ G-quadruplex tăng dần được thể hiện thành biểu đồ Hình 10.



**Hình 10.** Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ G-quadruplex đến sự dimer protein

Có thể thấy khi nồng độ G-quadruplex tăng từ 0 µM đến 500 µM, tỉ lệ cường độ huỳnh quang (525 nm/475 nm) cũng tăng và đạt cao nhất ở 500 µM. Khi nồng độ G-quadruplex tăng từ 500 µM đến 3000 µM thì lượng protein dimer giảm dần do lượng G-quadruplex dư cạnh tranh với protein dimer để liên kết với RHAU, làm giảm sự dimer hóa. Vì vậy, trong thí nghiệm này, nồng độ G-quadruplex 500 µM cho khả năng hình thành sự dimer hóa 2 protein RHAU-CFP và RHAU-YFP cao nhất. Nồng độ G-quadruplex tăng hơn mức này có thể dẫn đến cạnh tranh làm giảm lượng protein dimer.

### 3.6. Thảo luận

Có hơn 300.000 trình tự có khả năng hình thành G-quadruplex trong bộ gen người (Rhodes, & Lipps, 2015). Trong đó, G-quadruplex tồn tại nhiều nhất ở vùng ở telomere giàu guanine chứa trình tự lặp lại TTAGGG. Ngoài ra, G-quadruplex cũng được tìm thấy ở vùng promoter, vùng sao chép DNA, vùng 5'UTR của RNA. Các G-quadruplex này có liên quan đến nhiều quá trình sinh học như tăng sự ổn định cho telomere; điều hòa quá trình sao chép, phiên mã và dịch mã (Lipps, & Rhodes, 2009). Bên cạnh đó, G-quadruplex còn mang những ưu điểm đáng chú ý như có cấu trúc bền vững, kích thước nhỏ (có thể tạo G-quadruplex chỉ với 24 nucleotide) và dễ dàng tổng hợp hóa học (Hirashima, & Seimiya, 2015). Đặc biệt, cả G-quadruplex và RHAU đều là những sản phẩm tự nhiên trong tế bào người, do đó đặt ra triển vọng về sự an toàn cho tế bào khi nghiên cứu *in vivo*, triển vọng để phát triển thuốc và tiềm năng kích thích sự dimer ngay bên trong tế bào mà không cần đưa G-quadruplex từ ngoài vào trong tế bào.



FRET là sự truyền năng lượng từ một fluorophore thể cho ở trạng thái kích thích sang một fluorophore thể nhận (Hussain, 2009). Phản ứng FRET xảy ra sẽ làm giảm cường độ huỳnh quang của thể cho và tăng cường độ huỳnh quang của thể nhận. Protein CFP và YFP lần lượt là thể cho và thể nhận được sử dụng phổ biến trong phương pháp FRET (Bajar et al., 2016) do chúng dễ biểu hiện, bền, ánh sáng huỳnh quang dễ quan sát và quang phổ phát ra của CFP có phân trùng lặp với quang phổ hấp thụ của YFP. Việc kiểm tra hiện tượng FRET sẽ cho thấy sự tương tác hay truyền năng lượng giữa các phân tử nằm đủ gần (1 tới 10 nm), từ đó phản ánh được sự dimer của các phân tử đó. Kỹ thuật này đã được ứng dụng để chứng minh trạng thái dimer của nhiều phân tử như c-kit receptor (Broudy, Lin, Bühring, Komatsu, & Kavanagh, 1998), UVR8 (Liao, Zhang, Blatt, & Jenkins, 2019)... và vẫn đang là kỹ thuật đáng tin cậy trong nghiên cứu sự dimer hóa của nhiều phân tử sinh học khác.

#### 4. Kết luận

Protein RHAU-YFP đã được tạo dòng, biểu hiện thành công trong vi khuẩn *E. coli* với nồng độ chất cảm ứng là 0,05 mM IPTG ở 16°C và có thể được tinh chế thông qua cột HisTrap. Protein này có thể được dimer hóa với protein RHAU-CFP khi có sự hiện diện của phân tử G-quadruplex T95-2T và nồng độ G-quadruplex 500  $\mu$ M cho khả năng dimer hóa protein cao nhất trong điều kiện thí nghiệm. Nghiên cứu này chính là tiền đề trong việc ứng dụng G-quadruplex vào điều hòa hoạt động tế bào trong tương lai.

❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bajar, B. T., Wang, E. S., Zhang, S., Lin, M. Z., & Chu, J. (2016). A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs. *Sensors (Basel)*, 16(9). doi:10.3390/s16091488
- Ballister, E. R., Aonbangkhen, C., Mayo, A. M., Lampson, M. A., & Chenoweth, D. M. (2014). Localized light-induced protein dimerization in living cells using a photocaged dimerizer. *Nat Commun*, 5, 5475. doi:10.1038/ncomms6475
- Broudy, V. C., Lin, N. L., Bühring, H.-J. r., Komatsu, N., & Kavanagh, T. J. (1998). Analysis of c-kit Receptor Dimerization by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Blood*, 91(3), 898-906. doi:10.1182/blood.V91.3.898
- Dang, D. T., Nguyen, H. D., Merx, M., & Brunsveld, L. (2013). Supramolecular control of enzyme activity through cucurbit[8]uril-mediated dimerization. *Angew Chem Int Ed Engl*, 52(10), 2915-2919. doi:10.1002/anie.201208239
- Gellert, M., Lipsett, M. N., & Davies, D. R. (1962). Helix formation by guanylic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 48, 2013-2018. doi:10.1073/pnas.48.12.2013
- Gomes, I., Jordan, B. A., Gupta, A., Rios, C., Trapaidze, N., & Devi, L. A. (2001). G protein coupled receptor dimerization: implications in modulating receptor function. *J Mol Med (Berl)*, 79(5-6), 226-242. doi:10.1007/s001090100219

- Hill, Z. B., Martinko, A. J., Nguyen, D. P., & Wells, J. A. (2018). Human antibody-based chemically induced dimerizers for cell therapeutic applications. *Nat Chem Biol*, *14*(2), 112-117. doi:10.1038/nchembio.2529
- Hirashima, K., & Seimiya, H. (2015). Telomeric repeat-containing RNA/G-quadruplex-forming sequences cause genome-wide alteration of gene expression in human cancer cells in vivo. *Nucleic Acids Res*, *43*(4), 2022-2032. doi:10.1093/nar/gkv063
- Hussain, S. A. J. a. p. a. (2009). An introduction to fluorescence resonance energy transfer (FRET). Inobe, T., & Nukina, N. (2016). Rapamycin-induced oligomer formation system of FRB-FKBP fusion proteins. *J Biosci Bioeng*, *122*(1), 40-46. doi:10.1016/j.jbiosc.2015.12.004
- Lattmann, S., Giri, B., Vaughn, J. P., Akman, S. A., & Nagamine, Y. (2010). Role of the amino terminal RHAU-specific motif in the recognition and resolution of guanine quadruplex-RNA by the DEAH-box RNA helicase RHAU. *Nucleic Acids Res*, *38*(18), 6219-6233. doi:10.1093/nar/gkq372
- Liao, X., Zhang, B., Blatt, M. R., & Jenkins, G. I. (2019). A FRET method for investigating dimer/monomer status and conformation of the UVR8 photoreceptor. *Photochem Photobiol Sci*, *18*(2), 367-374. doi:10.1039/c8pp00489g
- Lipps, H. J., & Rhodes, D. (2009). G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. *Trends Cell Biol*, *19*(8), 414-422. doi:10.1016/j.tcb.2009.05.002
- Marianayagam, N. J., Sunde, M., & Matthews, J. M. (2004). The power of two: protein dimerization in biology. *Trends Biochem Sci*, *29*(11), 618-625. doi:10.1016/j.tibs.2004.09.006
- Matthews, J. M., & Visvader, J. E. (2003). LIM-domain-binding protein 1: a multifunctional cofactor that interacts with diverse proteins. *EMBO Rep*, *4*(12), 1132-1137. doi:10.1038/sj.embor.7400030
- Renatus, M., Stennicke, H. R., Scott, F. L., Liddington, R. C., & Salvesen, G. S. (2001). Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(25), 14250-14255. doi:10.1073/pnas.231465798
- Rhodes, D., & Lipps, H. J. (2015). G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Res*, *43*(18), 8627-8637. doi:10.1093/nar/gkv862
- Spencer, D. M., Wandless, T. J., Schreiber, S. L., & Crabtree, G. R. (1993). Controlling signal transduction with synthetic ligands. *Science*, *262*(5136), 1019-1024. doi:10.1126/science.7694365
- Sun, Z. Y., Wang, X. N., Cheng, S. Q., Su, X. X., & Ou, T. M. (2019). Developing Novel G-Quadruplex Ligands: from Interaction with Nucleic Acids to Interfering with Nucleic Acid(-)Protein Interaction. *Molecules*, *24*(3). doi:10.3390/molecules24030396
- Truong, T. T. T., Cao, C., & Dang, D. T. (2020). Parallel G-quadruplex-mediated protein dimerization and activation. *RSC Advances*, *10*(50), 29957-29960. doi:10.1039/d0ra06173e

**DIMERIZATION OF RHAU-FUSED PROTEINS BY PARALLEL G-QUADRUPLEX***Truong Thi Tinh Tuom<sup>1</sup>, Nguyen Dac Nguyen Phuc<sup>2</sup>**Phan Hung Viet<sup>3</sup>, Dang Thanh Dung<sup>3</sup>, Phan Thi Phuong Trang<sup>1\*</sup>*<sup>1</sup>University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam<sup>2</sup>Cranbrook Schools, USA<sup>3</sup>Ho Chi Minh City Open University, Vietnam\*Corresponding author: Phan Thi Phuong Trang – Email: [ptptrang@hcmus.edu.vn](mailto:ptptrang@hcmus.edu.vn)

Received: March 18, 2021; Revised: March 25, 2021; Accepted: March 30, 2021

**ABSTRACT**

The dimerization of proteins plays an important role in cellular activities such as enzyme activation, signal transmission through receptors and regulation of gene expression. Methods that mediate protein dimerization are introduced and developed to help regulate biological processes. G-quadruplex is a potential molecule mediating the dimerization of proteins through specifically binding to two RHAU peptides. However, to date, this function of G-quadruplex has not been extensively studied. In this study, we cloned vector pTD14 carrying the *yfp* gene fusing with RHAU peptide. RHAU-YFP protein was then expressed and purified. Dimerization of this protein and RHAU-CFP protein was mediated by G-quadruplex and observed by FRET reaction. The results showed that RHAU-YFP protein could be expressed from the cloned vector pTD14 under the temperature of 16°C and the IPTG concentration of 0.05 mM in 24 hours. The highest amount of the target protein was yielded with imidazole concentrations between 20 mM and 100 mM when purified through His-tag column. The FRET reaction showed that G-quadruplex was capable of mediating the dimerization of proteins RHAU-YFP and RHAU-CFP under the experimental conditions and G-quadruplex at concentration of 500 μM for the highest dimerization ability. The results can be used for further studies on the application of G-quadruplex to regulate biological processes in medical research.

**Keywords:** CFP; dimerization; FRET; G-quadruplex; RHAU; YFP