

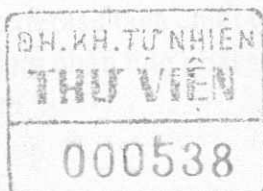
ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP. HCM
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

*BÁO CÁO NGHIỆM THU
ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC CẤP BỘ*

TÊN ĐỀ TÀI:

NGHIÊN CỨU LUCIFERASE CỦA ĐOM
ĐÓM VÀ ỨNG DỤNG TRONG ĐỊNH LƯỢNG
VI SINH VẬT BẰNG ATP

Mã số: B98-18-37



Chủ nhiệm: TS. TRẦN LINH THƯỚC

Thời gian thực hiện: 06/1998 - 06/1999

MỤC LỤC

	Trang
I. MỞ ĐẦU	2
II. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	
2.1. Hiện tượng phát sáng sinh học	5
2.2. Sự phát sáng sinh học ở Đom Đóm	5
2.3. Sinh hóa học của phản ứng phát sáng ở Đom Đóm	6
2.3.1. Các thành phần của phản ứng phát sáng	6
2.3.2. Cơ chế của phản ứng phát sáng	8
2.3.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng phát sáng sinh học ở Đom Đóm	9
2.4. Tinh chế luciferase từ Đom Đóm <i>Photinus pyralis</i>	11
2.5. Ứng dụng của phản ứng phát sáng sinh học ở Đom Đóm	11
2.6. Định lượng ATP bằng phản ứng phát sáng sinh học	12
2.7. Định lượng vi sinh vật bằng phản ứng phát sáng sinh học của Đom Đóm	12
II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	16
IV. KẾT QUẢ	19
4.1. Khảo sát, thu bắt và định danh Đom Đóm	19
4.2. Tách chiết và tinh chế sơ bộ luciferase từ Đom Đóm	21
4.3. Xác định lượng luciferase, luciferin, nồng độ Mg^{2+} trong phản ứng phát sáng	23
4.4. Điều kiện trích ly trích ATP ra khỏi tế bào vi sinh vật	25
4.5. Xây dựng đường tương quan giữa mật độ tế bào vi sinh vật và lượng ánh sáng phát ra (RLU)	28
4.6. Định lượng ATP bằng luciferase tách chiết từ Đom Đóm	29
4.7. Định lượng vi sinh vật bằng phản ứng phát sáng sinh học sử dụng luciferase từ Đom Đóm	31
V. KẾT LUẬN	32
VI. TÀI LIỆU THAM KHẢO	34
VII. CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI	36

I. MỞ ĐẦU

Bệnh gây ra bởi thực phẩm luôn là mối lo ngại của các nhà sản xuất, chế biến thực phẩm, của các cơ quan quản lý vệ sinh thực phẩm và của người tiêu dùng. Vi sinh vật là nguyên nhân quan trọng nhất trong gây bệnh do thực phẩm. Người tiêu dùng ngày nay đòi hỏi các nhà sản xuất, chế biến thực phẩm phải đảm bảo cung cấp thực phẩm vệ sinh, an toàn, nhất là về mặt vi sinh vật. Do vậy, an toàn, vệ sinh đã trở thành tiêu chuẩn chất lượng quan trọng của thực phẩm trên thế giới. Hiện nay, để đảm bảo chất lượng quan trọng này, các nhà sản xuất, chế biến thực phẩm trên thế giới thường sử dụng hệ thống quản lý chất lượng mới gọi là HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point, Phân tích các mối nguy và Điểm kiểm soát tới hạn). Đây là một hệ thống quản lý vệ sinh thực phẩm dựa trên sự phòng ngừa sự nhiễm vi sinh vật gây bệnh trên tất cả công đoạn sản xuất và chế biến, từ nguyên liệu, chuẩn bị sản xuất, trong quá trình sản xuất cho đến thành phẩm.

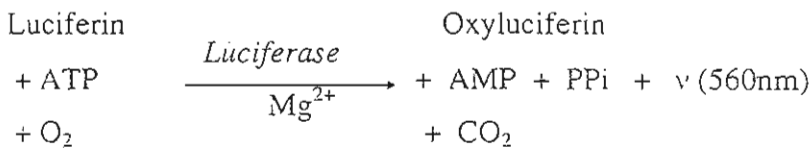
Để đảm bảo hệ thống này hoạt động được tốt, các nhà vi sinh vật học đã nghiên cứu các phương pháp phân tích vi sinh vật cho kết quả nhanh thay cho phương pháp vi sinh vật truyền thống (cần thời gian nuôi cấy, xác định lâu, cho kết quả chậm).

Ở Việt nam, hầu hết các đơn vị sản xuất và chế biến thực phẩm đang triển khai mạnh việc xây dựng hệ thống HACCP để xuất khẩu sản phẩm, tăng khả năng cạnh tranh trên thị trường thế giới. Các phương pháp vi sinh vật nhanh là công cụ rất hữu hiệu giúp các nhà sản xuất và chế biến thực phẩm xuất khẩu xây dựng hệ thống HACCP.

Giám sát vệ sinh bề mặt (thiết bị, dụng cụ... của dây chuyền sản xuất) là yêu cầu rất quan trọng trong sản xuất và chế biến thực phẩm theo chương trình HACCP. Việc giám sát này có thể được thực hiện thông qua xác định mật độ tổng vi sinh vật hiện diện trên một diện tích bề mặt. Tổng vi sinh vật hiện diện trong một đơn vị khối lượng sản phẩm cũng là chỉ tiêu vệ sinh vi sinh vật cần được kiểm soát trong hầu hết thực phẩm chế biến.

Để kiểm tra mật độ tổng vi sinh vật này, phương pháp thông dụng là đếm số khuẩn lạc. Phương pháp này thường cần ít nhất một ngày mới cho kết quả, do vậy không thích hợp với yêu cầu của HACCP.

Một trong những phương pháp nhanh được sử dụng nhiều là phương pháp kiểm tra nhanh vi sinh vật bằng ATP dựa trên sự phát sáng sinh học bởi phản ứng luciferin-luciferasae khi có sự hiện diện của ion Mg^{2+} và cần ATP theo phản ứng sau:



Một phân tử luciferin khi bị ôxy hóa theo phương trình nêu trên sẽ phóng thích một quang tử ánh sáng. ATP là một cơ chất tham gia vào phản ứng phát sáng và số lượng quang tử ánh sáng phát ra tỷ lệ thuận với số lượng phân tử ATP tham gia vào phản ứng. Trong điều kiện có sự hiện diện thừa của luciferin, luciferase, lượng ánh sáng sinh ra bởi phản ứng này sẽ phụ thuộc vào lượng ATP hiện diện trong phản ứng. Bằng một thiết bị có khả năng đếm được lượng ánh sáng phát ra, người ta có thể định lượng được lượng ATP dựa vào một đường chuẩn thể hiện mối tương quan giữa lượng ánh sáng đo được và lượng ATP.

Mặt khác, tất cả tế bào sinh vật đều chứa ATP có lượng tương đối ổn định (lượng ATP trung bình ở vi sinh vật là 0,3fg/tế bào hay $0,3 \times 10^{-15}$ g/tế bào). Do vậy, về nguyên tắc, có thể định lượng vi sinh vật bằng trị số ATP dựa trên một đường chuẩn thể hiện mối tương quan tuyến tính giữa lượng ATP đo được và lượng tế bào vi sinh vật (được xác định bằng phương pháp đếm số khuẩn lạc thông thường).

Qui trình định lượng vi sinh vật bằng phản ứng phát sáng luciferin-luciferase có thể được tóm tắt như sau: từ huyền phù tế bào vi sinh vật, tiến hành ly trích ATP ra khỏi tế bào. Chuyển một phần dịch ly trích vào ống đo, sau đó bổ sung hỗn hợp luciferin-luciferase. Đặt ống đo vào buồng đo của thiết bị đo để định lượng ánh sáng RLU phát ra. Qui đổi lượng RLU thành lượng ATP và qui đổi lượng ATP thành mật độ tế bào.

Ưu điểm của phương pháp này là dễ thực hiện, độ nhạy cao và có thể xác định một cách chính xác mật độ vi sinh vật chỉ trong vài phút^{2,4}. Do vậy, có thể dùng phương pháp này để kiểm tra nhanh chóng nguyên liệu tại hiện trường, trước khi nhập kho, có thể kiểm tra tình trạng vệ sinh của thiết bị, nhà xưởng trước khi vào sản xuất, có thể theo dõi phát hiện ngay sự nhiễm vi sinh vật trong khi sản xuất, nhờ vậy có thể có biện pháp xử lý khắc phục ngay.... Phương pháp này đã được sử dụng nhiều bởi các nhà sản xuất và chế biến thực phẩm lớn trên thế giới từ những năm 1980.

Hiện nay, nhiều hãng sản xuất nước ngoài đang chào bán các thiết bị, hóa chất phục vụ kiểm tra nhanh vi sinh vật bằng ATP. Tuy nhiên, việc áp dụng phương pháp này tại Việt Nam gặp khó khăn là thiết bị, hóa chất đắt tiền và chi phí kiểm tra cao. Để có thể ứng dụng phương pháp này vào phục vụ thực tiễn sản xuất tại Việt Nam cần có các nghiên cứu nhằm chế tạo thiết bị và hóa chất trong nước với giá thành hợp lý.

Trong một đề tài khác do Sở Khoa học Công nghệ Môi trường quản lý, chúng tôi đã thực hiện việc nghiên cứu chế tạo thiết bị và nghiên cứu thành phần hóa chất của phản ứng phát sáng làm cơ sở cho việc tạo thành thiết bị đếm ánh sáng rẽ tiền tại Việt Nam và tạo bộ hóa chất phản ứng phục vụ cho nhu cầu ứng dụng của phương pháp này tại Việt Nam. Đề tài cấp bộ này được giới hạn nội dung trong việc xây dựng quy trình thu nhận luciferase (là thành phần đặc tiền nhất của phản ứng phát sáng) từ đom đóm, khảo sát các điều kiện để sử dụng nguồn enzyme này phục vụ cho việc định lượng ATP và định lượng nhanh vi sinh vật.

II. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Hiện tượng phát sáng sinh học

Phát sáng sinh học (bioluminescence) là hiện tượng phát ra ánh sáng nhìn thấy được ở các sinh vật sống do sự ôxi hoá các hợp chất hữu cơ trung gian là luciferin. Phát sáng sinh học là một dạng của phát sáng hoá học (chemiluminescence), trong đó phản ứng hoá học tạo ra ánh sáng được xúc tác bởi enzyme với sự hiện diện của ôxi không khí. Hiện tượng phát sáng sinh học thường phổ biến ở các sinh vật sống ở biển và ít phổ biến hơn ở sinh vật trên cạn. Các sinh vật có khả năng phát sáng bao gồm các nhóm khác nhau như cá, vi khuẩn, nấm, côn trùng, sữa, tảo, giun đất và mực¹. Trong các nhóm động vật phát sáng, một số có khả năng tự phát sáng nhờ các cơ quan đặt biệt trên cơ thể, còn một số nhóm có khả năng phát sáng là do sự cộng sinh với vi khuẩn phát sáng. Về ý nghĩa sinh học, sự phát sáng sinh học giúp sinh vật săn mồi, tìm bạn tình và chống kẻ thù. Mặc dù sự phát sáng sinh học ở các sinh vật là khác nhau về màu sắc, cường độ sáng, tập tính phát sáng..., nhưng tất cả phản ứng phát sáng sinh học đều cần một oxygenase có tên gọi chung là luciferase xúc tác sự ôxi hoá luciferin tạo ra một phức hợp trung gian không bền và phát sáng². Hiện nay có bốn hệ thống phát sáng được nghiên cứu nhiều nhất là hệ thống ở tảo dinoflagellates, ở sữa, ở vi khuẩn và ở đom đóm.

2.2. Sự phát sáng sinh học ở Đom Đóm

Đom đóm là loài côn trùng thuộc họ cánh cứng *Lampridae* (còn gọi là *Coleoptera*). Có khoảng 2000 loài đom đóm đã được biết, phân bố khắp các vùng trên trái đất trừ vùng Nam cực, phần lớn tập trung hiện diện ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Đom Đóm trưởng thành là những con bọ cánh cứng, thân mềm, có chiều dài rất biến thiên từ khoảng 5mm đến khoảng 25mm. Mỗi loài Đom Đóm khác nhau đều có một môi trường sống riêng nhưng có đặc điểm chung là thích sống độ ẩm cao.

Không phải tất cả các loài đom đóm đều có khả năng phát sáng. Ở những loài đom đóm có khả năng phát sáng, tập tính phát sáng rất đa dạng, thời điểm bắt đầu phát sáng cũng rất khác nhau ở các loài. Một số loài bắt đầu phát sáng khi trời vừa bắt đầu tối, một số loài khác lại bắt đầu phát sáng khi trời đã hoàn toàn tối và tiếp tục phát sáng cho tới khuya. Vào mùa sinh sản, đom đóm phát sáng để dẫn dụ cá thể khác giới. Đom đóm trưởng thành phát sáng nhờ vào các tế bào đặc biệt có khả năng tạo ra ánh sáng nằm trong một cơ quan ở phần cuối của mặt bụng. Các tế bào này chứa enzyme luciferase trong các peroxisome. Lượng ánh sáng phát ra được kiểm soát bằng dòng khí ôxi theo hệ thống ống dẫn khí ở bụng hoặc các lỗ bụng để đi vào cơ quan phát sáng và vào tế bào phát sáng. Trong tế bào này luciferase sẽ xúc tác phản ứng ôxi hóa cơ chất luciferin với sự tham gia của ion Mg^{+2} cũng. Kết quả của

quá trình này làm phát ra ánh sáng nhìn thấy được.

2.3. Sinh hóa học của phản ứng phát sáng ở Đom Đóm

Mặc dù hiện tượng phát sáng ở đom đóm đã được biết từ lâu như các đặc trưng sinh hóa của phản ứng phát sáng chỉ được tập trung nghiên cứu từ cuối thế kỷ 19. Năm 1884, Dubois là người đầu tiên chứng minh phản ứng luciferase - luciferin trong dịch đồng nhất của lồng đèn đom đóm và sau đó cho rằng có ba chất cơ bản liên quan tới sự phát sáng ở đom đóm là một hợp chất hữu cơ gọi là luciferin có khả năng bị ôxi hoá, một enzyme chuyên biệt là luciferase và ôxi của không khí¹. Năm 1947 khi W. D. McElroy chứng minh ATP là cần thiết cho phản ứng phát sáng^{1,3}. Hiện nay, gen mã hoá luciferase từ đom đóm đã được tạo dòng, giải trình tự; enzyme luciferase tái tổ hợp đã được biểu hiện vượt mức^{4,5,6} và nghiên cứu cấu trúc phân tử^{7,8}.

2.3.1. Các thành phần của phản ứng phát sáng

- Adenosine triphosphate (ATP)

ATP giữ vai trò là chất mang năng lượng trong sinh vật và chỉ hiện diện trong tế bào sống. Trong tế bào chết, ATP nhanh chóng bị phân hủy trong vài phút. Lượng ATP trung bình trong một tế bào sống là khoảng 1fg (10^{-15} g). Ở prokaryote, lượng ATP trong tế bào ở phage log là khoảng 2 – 6nmole/mg sinh khối khô. Các tế bào già, tế bào không hoạt động, tế bào bị stress có mức ATP thấp hơn mức ATP trong tế bào bình thường. Do vậy, lượng ATP trong tế bào có thể được sử dụng để chỉ thị trạng thái biến dưỡng của tế bào⁹. Trong tế bào, ATP tham gia vào việc vận chuyển các vật chất qua màng tế bào, cung cấp năng lượng cho sự co cơ, tạo sự quay của tiên mao giúp tế bào di động, cung cấp năng lượng cho các phản ứng đồng hóa, tham gia kiểm soát các phản ứng sinh hoá và truyền thông tin trong tế bào⁹.

- Ion Mg^{2+}

Ion Mg^{2+} có vai trò rất quan trọng trong phản ứng phát sáng sinh học luciferase – luciferin ở đom đóm bằng cách kết hợp với ATP để trở thành cơ chất thực sự gắn vào luciferase⁹.

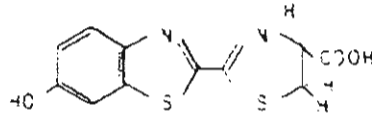
- Ôxi

Ôxi là yếu tố trọng trong việc kiểm soát sự phát sáng ở đom đóm trường thành: độ dài của tia sáng, khoảng cách thời gian giữa các lần phát sáng được kiểm soát bởi dòng ôxi^{1,10}.

- Luciferin

Luciferin là cơ chất cần thiết cho phản ứng phát sáng sinh học. Luciferin ở đom đóm chỉ hiện diện trong các cơ quan phát sáng. Ở đom đóm *Photinus pyralis*,

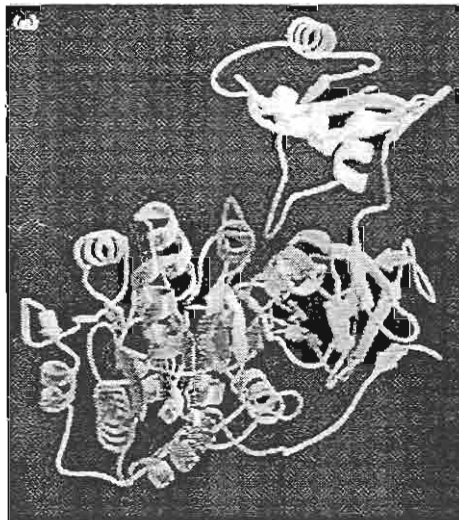
luciferin đã đượcxác định là D-(-)-2-(6'-hydroxy-2'-benzothiazolyl)-Δ'-thiazoline-4-carboxylic (Hình 2.1), có công thức $C_{13}H_{12}N_2S_2O_3$. Luciferin (LH₂) có hai đồng phân là dehydroluciferin (L) và dehydroluciferol (LOH). Luciferin có tinh thể hình kim, bị phân hủy ở 205 – 210°C và hoá nâu ở 170°C, tan trong nước, rượu C₁ – C₅, acetone và ethyl acetate nhưng không tan trong benzene, ether dầu, ethyl ether và CCl₄. Đỉnh hấp thu cực đại của luciferin thay đổi tùy pH của dung dịch. Luciferin bền với nhiệt, nhưng không bền với axit và kiềm: bị thủy phân hoàn toàn trong vòng 30 phút trong H₂SO₄ 0,01N hoặc trong NaOH 0,5N ở 100°C.



Hình 2.1. Cấu trúc D- luciferin đom đóm

- Luciferase

Tinh thể luciferase có độ tinh sạch cao đầu tiên được chiết tách từ loài Đom Đóm *Photinus pyralis* ở Bắc Mỹ và cấu trúc phân tử của enzyme này đã được thiết lập (Hình 2.2).



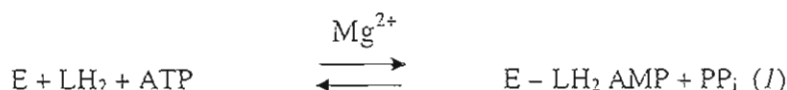
Hình 2.2. Cấu trúc phân tử của luciferase của Đom Đóm *Photinus pyralis*

Luciferase có trọng lượng phân tử khoảng 50kDa. Enzyme này nhanh chóng bị kết tủa một cách thuận nghịch trong dung dịch có lực ion thấp: enzyme chỉ bị tủa khi nồng độ enzyme là 2mg/ml trong đệm phosphate 0,1M, pH 7,8 nhưng đã bắt đầu tủa từ nồng độ 0,2mg/ml trong đệm phosphate loãng 0,01M, pH 7,8. Luciferase dễ kết tủa vì chứa tỉ lệ cao của các amino acid không phân cực. Enzyme này có thể tái

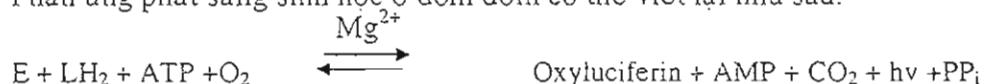
gấp cuộn và phục hồi hoạt tính sau khi bị biến tính bởi nồng độ cao guanidine hydrochloride^{11,12}. Enzyme có hoạt tính ở dạng nhị phân (homodimer) với 6 – 7 nhóm sulfhydryl hoạt động bị bất hoạt bởi *p*-mercuribenzoate (PMB). Trong số này có 2 nhóm sulfhydryl là cần thiết cho hoạt tính và hiện diện ở tại hoặc gần vị trí kết hợp với luciferin.

2.3.2. Cơ chế của phản ứng phát sáng

Sự phát sáng sinh học của đom đóm trong tự nhiên là sự phát sinh ánh sáng dựa trên phản ứng ôxi hóa luciferin bởi enzyme luciferase. Khi có sự hiện diện của luciferin, ATP và Mg²⁺, enzyme luciferase sẽ xúc tác phản ứng phát sáng sinh học theo hai giai đoạn như sau:



Phản ứng phát sáng sinh học ở đom đóm có thể viết lại như sau:

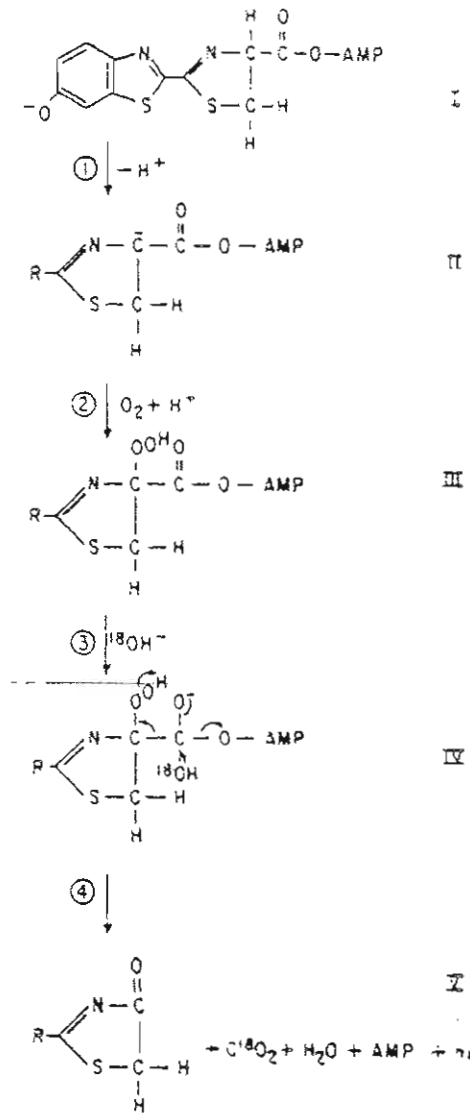


E: luciferase, LH₂: luciferin

Phản ứng (1) tạo thành phức hợp enzyme-luciferyl-adenylate (E-LH₂-AMP). Phản ứng này tương tự phản ứng hoạt hóa axit béo và amino acid trong đó nhóm carboxyl của cơ chất được nối với nhóm phosphoryl của AMP thông qua một liên kết anhydride. Trong phản ứng (2) phức hợp E-LH₂-AMP phản ứng với O₂ tạo ra CO₂, AMP, oxyluciferin và ánh sáng màu vàng – xanh với bước sóng 562nm. Nếu sử dụng LH₂-AMP tổng hợp hóa học, phản ứng phát sáng được thực hiện mà không cần ATP. Phản ứng xảy ra khi có thừa luciferin, số lượng quang tử (quantum) được tạo ra trong trường hợp này ở pH kiềm là 0,88. Một mole ôxi được tiêu thụ cho mỗi mole luciferin và tạo ra 1 mole CO₂^{11,12}.

Nhiều thí nghiệm đã thực hiện để tìm hiểu trình tự của phản ứng ôxi hoá luciferyl-adenylate. Cơ chế của phản ứng được minh họa như Hình 2.3. Phản ứng thứ nhất là sự tách một proton từ C4. Sự thay thế một đồng vị H deuterium tại vị trí này sẽ ức chế 50% lượng ánh sáng phát sáng ra. Phản ứng thứ hai là việc gắn phân tử ôxi vào vị trí C4 để hình thành một hydroperoxide. Tiếp theo, là sự gắn một nhóm OH vào carbon của nhóm carbonyl và thủy phân peroxide để tạo thành nước, CO₂, AMP và một sản phẩm ở trạng thái kích hoạt. Một trong những nguyên tử ôxi trong CO₂ được hình thành từ nước. Sản phẩm ở trạng thái bị kích hoạt khi trở về trạng thái nền

sẽ phát ra ánh sáng có bước sóng 562nm (loài *Photinus pyralis*). Sự phát sáng ở các loài đom đóm khác nhau là không giống nhau. Sự khác nhau này là do cấu trúc enzyme luciferas



Hình 2.3. Cơ chế phản ứng ôxi hoá luciferyl-adenylate

2.3.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng phát sáng sinh học ở Đom Đóm

- Nhiệt độ

Nhiệt độ thích hợp cho phản ứng là 25°C. Ở nhiệt độ 30°C có sự giảm 20% ánh sáng phát ra, trong khi đó ở 20°C ánh sáng phát ra chỉ giảm 5%¹².

- Dung dịch đệm và pH

Dung dịch đệm Tricine 0,025M pH 7,8 là dung dịch chuẩn dùng cho phản ứng phát sáng được xúc tác bởi luciferase. Các giá trị pH kiềm hay axit đều ảnh hưởng không tốt đến phản ứng phát sáng¹².

- Các hợp chất tác động lên nhóm sulfhydryl

Những hợp chất tác động lên nhóm sulfhydryl (*p*-chloro-mercuribenzoate, CdCl₂, γ -(*p*-arsenosphenyl)-*n*-butyric, các chất dithiol...) đều ức chế phản ứng phát sáng xúc tác bởi luciferase. Do vậy, luciferase thường được bảo vệ bởi các tác nhân khử như 1mM β -mercaptoethanol hay 1mM dithiothreitol^{3,13}.

- Ion

Mặc dù phản ứng phát sáng này cần ion Mg²⁺ nhưng một ion khác như Ca²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Hg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, KCN⁻, I⁻, NO₃⁻, Br⁻, Cl⁻ lại ảnh hưởng đến phản ứng phát sáng, làm peak ánh sáng chuyển vào vùng ánh sáng đỏ^{3,13}.

- Các hợp chất tác động lên vị trí gắn luciferin

Luciferin là một trong những thành phần quan trọng của phản ứng và sẽ gắn vào luciferase để tạo phức hợp luciferase-luciferyl-adenylate, một phức hợp khởi điểm cho phản ứng phát sáng. Vì vậy, nếu trong dung dịch có sự hiện diện các chất có khả năng gắn vào vị trí nối luciferin trên luciferase, các chất này (như L-1-Tosylamido-2-phenethyl chloromethyl ketone, ethyl 2-benzothiazole-sulfonate...) sẽ ức chế sự phát sáng^{3,13}.

- Sản phẩm phản ứng phát sáng

Oxiluciferin là sản phẩm của phản ứng phát sáng có tác dụng kìm hãm ngược phản ứng phát sáng này. Tương tự, pyrophosphate vô cơ (PP_i) là sản phẩm của phản ứng đồng thời cũng ức chế phản ứng phát sáng khi tích tụ ở nồng độ trên 10 μ M¹³.

- Chất ổn định luciferase

Bovine serum albumine (BSA) ở nồng độ 0,1% hoặc glycerol 10% giúp ổn định hoạt tính luciferase đã được tinh chế^{3,14}.

- Các chất tăng cường

Một số nucleotide (cytidine, etheno-ATP, 8-Azido-ADP...) và coenzyme A được chứng minh có tác dụng tăng cường ánh sáng phát ra trong phản ứng xúc tác bởi luciferase. Một số tác giả đã thành công trong việc sử dụng các liposome từ cholesterol để tăng cường ánh sáng phát ra trong sự hiện diện của ATP ở nồng độ thấp (1 μ M – 5,5nM)¹⁴.

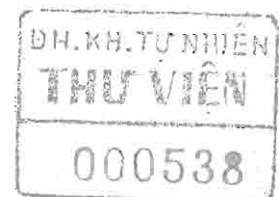
2.4. Tinh chế luciferase từ Đom Đóm *Photinus pyralis*

Deluca và McElroy lần đầu tiên đã thành công trong việc tách chiết, tinh chế và kết tinh từ đom đóm¹³. Đom đóm được làm khô trong bình hút ẩm bởi CaCl_2 và hút chân không trong 24 giờ. Lồng đèn (cơ quan phát sáng) được tách ra và được bảo quản ở -20°C cho đến khi tách chiết luciferase. Lồng đèn được nghiền kỹ thành bột trong lạnh bằng cối chày sứ. Bột được chiết hai lần với acetone lạnh để loại lipid và các thành phần tạp nhiễm khác. Dịch chiết được lọc qua giấy lọc để trong lạnh cho tới khô và thành dạng bột. Bột acetone được chiết lần thứ nhất với dung dịch 10% ammonium sulfate, 1mM EDTA pH 8,0 lạnh. Dùng NaOH 1N để khống chế pH trong giới hạn 7,5 – 8,0 trong quá trình chiết tách. Dịch chiết được ly tâm 7000g, 20 – 30 phút trong lạnh. Thu lấy dịch nổi lần thứ nhất, giữ trong đá. Cặn được chiết lần hai với dung dịch trên và ly tâm 7000g, 20 – 30 phút trong lạnh. Thu lấy dịch nổi lần hai và bỏ cặn. Trộn dịch lần 1 và 2. Ly tâm 20.000g, hơn 30 phút trong lạnh. Thu lấy dịch nổi và giữ trong lạnh, loại bỏ cặn. Dịch thu được là dịch luciferase thô có thể sử dụng trong việc thử ATP. Để tinh chế và kết tinh luciferase, bột lồng đèn được chiết hai lần với EDTA 1mM pH 8,0 lạnh. Luciferase trong dịch chiết được hấp phụ lên gel calcium phosphate và được dung ly bằng dung dịch 20% ammonium sulfate bão hòa chứa EDTA 1mM ở pH 8,0. Nâng nồng độ ammonium sulfate bão hòa lên 40% bằng bột ammonium sulfate để loại bỏ protein tạp. Ly tâm, bỏ tủa. Luciferase được tủa phân đoạn tại nồng độ 50% và 60% ammonium sulfate bão hòa. Ly tâm thu nhận tủa luciferase và hoà tan trong một thể tích nhỏ của 10% ammonium sulfate EDTA 1mM pH 8. Luciferase sẽ tạo tinh thể khi được thẩm tích qua đệm trong dung dịch 1mM EDTA, 10mM NaCl và 2mM Na_2HPO_4 , pH 7,3 lạnh.

Ngoài qui trình trên, luciferase từ đom đóm và luciferase tái tổ hợp còn được tinh chế bằng nhiều qui trình khác sử dụng các kỹ thuật sắc ký như lọc gel, trao đổi anion, ái lực, tương tác kỵ nước và sắc ký lỏng cao áp (HPLC)¹¹.

2.5. Ứng dụng của phản ứng phát sáng sinh học ở Đom Đóm

Trong bốn hệ thống phát sáng sinh học được nghiên cứu, hai hệ thống phát sáng ở vi khuẩn và Đom Đóm được nghiên cứu kỹ và được ứng dụng rộng rãi nhất. Tuy nhiên, trong ứng dụng, hệ thống phát sáng ở đom đóm có tính ưu việt hơn ở một số điểm như sau: (1) Sử dụng cơ chất là ATP là hợp chất mang năng lượng, ổn định trong môi trường tế bào và liên quan trực tiếp tới sự sống của tế bào sinh vật. Thông qua định lượng ATP có thể thu được nhiều thông tin cần thiết trong hoạt động sống của tế bào; (2) Hiệu suất chuyển hóa năng lượng hóa học sang năng lượng ánh sáng đạt từ 88 – 90% (ở vi khuẩn chỉ từ 5 – 10%) nên độ nhạy của phản ứng phát sáng của đom đóm cao hơn rất nhiều so với vi khuẩn; (3) Luciferase ở Đom Đóm được mã hóa chỉ bởi 1 gen *luc* luciferase; Khi được ứng dụng làm gen chỉ thị trong các nghiên cứu về



sinh học phân tử và kỹ thuật gen, để biểu hiện gen này thu luciferase chỉ cần bổ sung luciferin là đủ. Trong khi đó, ở hệ thống vi khuẩn cần có 2 gen là *luxA*, *luxB*, cần bổ sung thêm FMNH₂ ngoại bào có đặc tính dễ bị ôxi hóa và phản ứng chậm nên không thích hợp để nghiên cứu sinh lý tế bào bằng chỉ thị là gen luciferase của vi khuẩn; (4) Trong *in vitro*, hệ thống phát sáng ở đom đóm dễ sử dụng hơn hệ thống phát sáng ở vi khuẩn. Do các ưu điểm này nên hiện nay hệ thống phát sáng ở đom đóm được ứng dụng rộng rãi trong việc định lượng ATP, trong nghiên cứu sinh lý tế bào, định lượng nhanh vi sinh vật thông qua ATP và dùng làm gen chỉ thị².

2.6. Định lượng ATP bằng phản ứng phát sáng sinh học

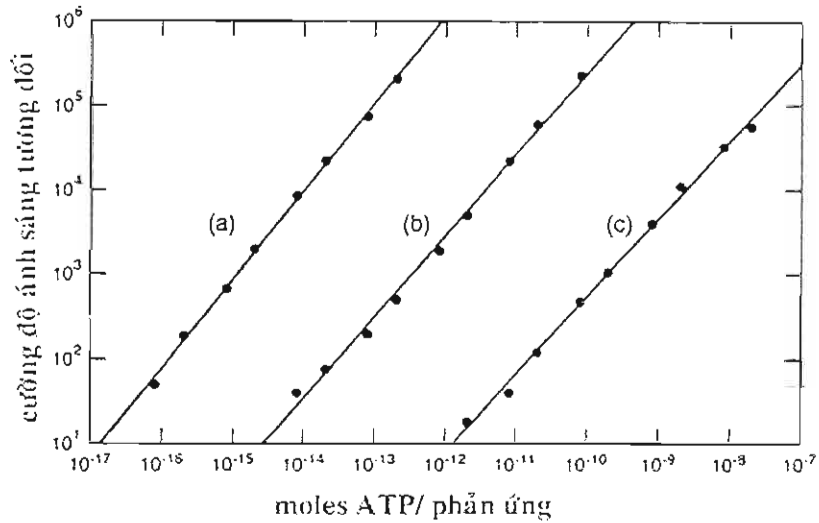
Định lượng ATP bằng phản ứng phát sáng sinh học có ưu điểm là độ nhạy cao, chính xác, nhanh và dễ sử dụng. ATP là tiền tệ năng lượng của tế bào, chỉ hiện diện khi tế bào còn sống và được duy trì ổn định trong tế bào. ATP được tổng hợp trong các con đường biến dưỡng của tế bào. Vì vậy, các yếu tố ảnh hưởng tới sinh lý của tế bào đều ảnh hưởng tới mức ATP. Bằng cách đo sự hiện diện của ATP trong tế bào có thể biết được trạng thái sinh lý tế bào lúc tiến hành thí nghiệm. Từ đó, có những kết quả về ảnh hưởng của các yếu tố lên tế bào¹⁴.

Phương pháp định lượng ATP bằng phản ứng phát sáng ở đom đóm được dựa trên cơ sở là trong điều kiện có thừa luciferase, 1 mole O₂ phản ứng với 1 mole cơ chất ATP sẽ sinh ra 1 mole CO₂ và một quang tử ánh sáng. Như vậy, lượng ánh sáng phát ra tỉ lệ với lượng ATP. Bằng thực nghiệm, người ta chứng minh được có mối tương quan tuyến tính giữa lượng ánh sáng phát ra (RLU) và lượng ATP (Hình 4). Mặt khác, khảo sát động học đã cho thấy vận tốc phản ứng phát sáng hay số photon ánh sáng tạo ra trong 1 giây sẽ cực đại trong vòng chưa đầy một giây sau khi bắt đầu phản ứng. Sau đó tốc độ này tương đối ổn định với sự giảm dưới 5% mỗi phút (Hình 2.5). Như vậy, bằng một thiết bị có khả năng đếm được số photon ánh sáng và có khả năng tích hợp tổng photon trong một khoảng thời gian ngắn, ví dụ là mười giây, thì có thể định lượng được ATP bằng cách dựa vào một đường chuẩn thể hiện mối tương quan giữa lượng ánh sáng đo được và lượng ATP (Hình 2.4). Phương pháp này có thể giúp xác định tới mức 10⁻¹⁶ moles ATP¹⁵.

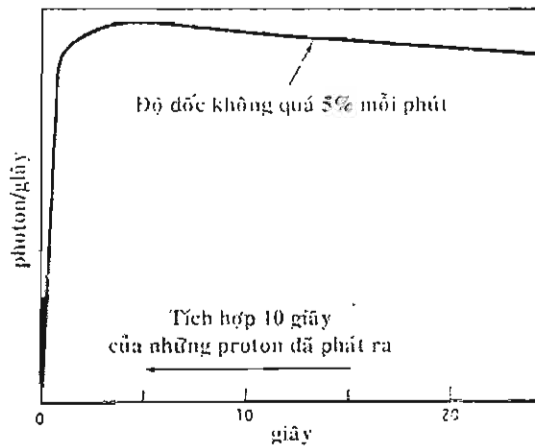
2.7. Định lượng vi sinh vật bằng phản ứng phát sáng sinh học của Đom Đóm

Tất cả tế bào sống đều có chứa ATP ở mức tương đối ổn định (10⁻¹⁸ - 10⁻¹⁷ mole/tế bào). Ở prokaryotes, lượng ATP trong các tế bào ở pha log thường vào khoảng 2 - 6 nmole ATP/mg sinh khối khô. Lượng ATP trung bình ở vi sinh vật là 0,3fg/tế bào (một fetogram, fg, bằng 10⁻¹⁵g). Do ATP nhanh chóng biến mất đi sau khi tế bào chết, nên ATP là một trị số có tương quan tuyến tính với số lượng tế bào sống. Do vậy, về nguyên tắc, có thể định lượng vi sinh vật bằng phản ứng phát sáng

sinh học bằng cách đo lượng ánh sáng phát ra bởi ATP của tế bào vi sinh vật dựa vào một đường chuẩn thể hiện mối tương quan tuyến tính giữa lượng ánh sáng đo được và mật độ tế bào vi sinh vật (được xác định bằng phương pháp đếm số khuẩn lạc thông thường) (Hình 2.6).



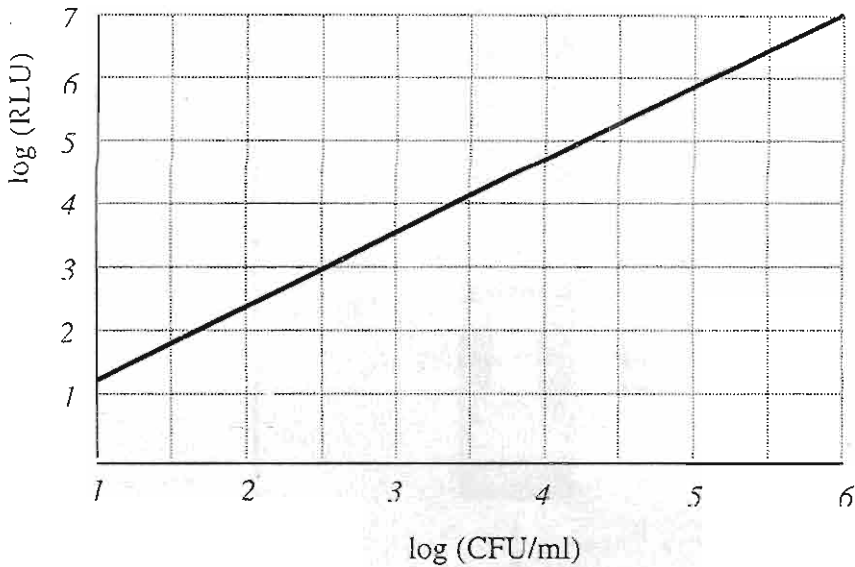
Hình 2.4. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa lượng ánh sáng đo được và lượng ATP



Hình 2.5. Đồ thị biểu diễn sự ổn định ánh sáng phát ra

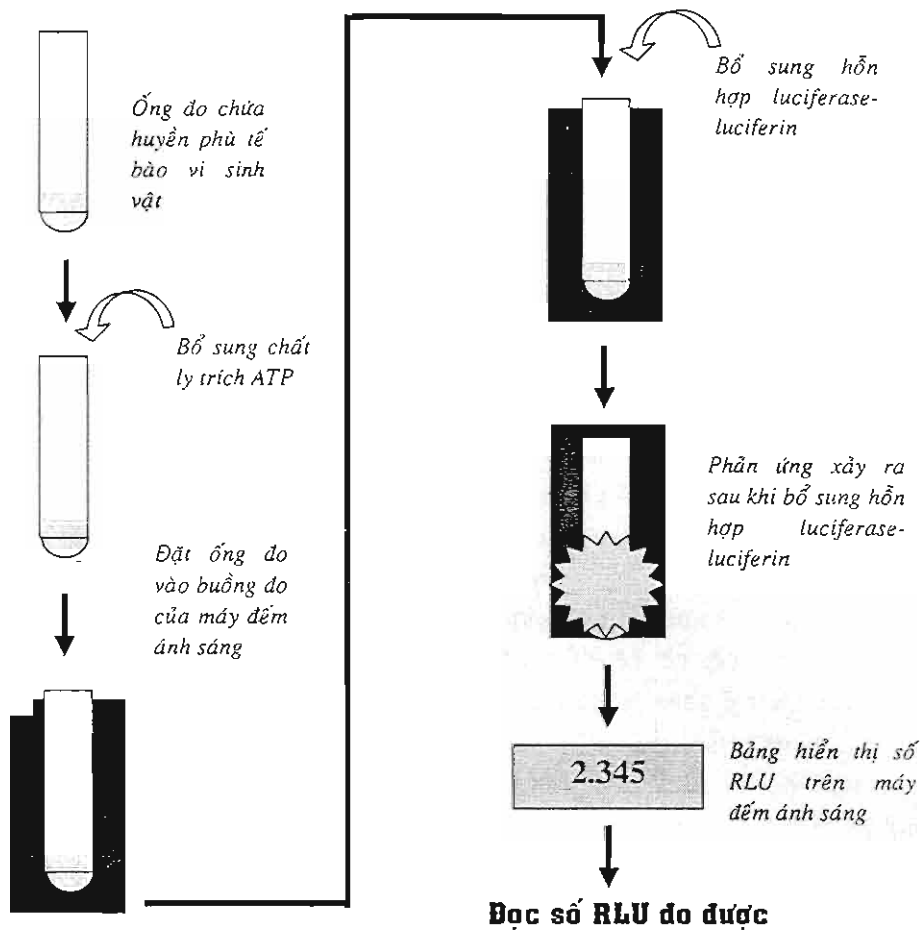
Như vậy, phương pháp định lượng vi sinh vật bằng phản ứng phát sáng là một phương pháp định lượng gián tiếp mật độ vi sinh vật thông qua lượng ATP trong tế bào vi sinh vật tham gia vào phản ứng phát sáng sinh học. Phương pháp này cho phép định lượng rất nhanh số lượng tế bào vi sinh vật sống đang hiện diện trong mẫu vật.

Một nhược điểm của phương pháp này là không phân biệt được chủng loại tế bào vi sinh vật. Do vậy, phương pháp này chỉ được dùng để định lượng tổng vi sinh vật hiện diện trong mẫu.



Hình 2.6 . Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa mật độ tế bào (CFU/ml) và lượng ánh sáng đo được

Qui trình định lượng vi sinh vật bằng phản ứng phát sáng luciferin - luciferase cần ATP có thể được tóm tắt như sau: hút huyền phù tế bào vi sinh vật vào ống đo, tiến hành ly trích ATP ra khỏi tế bào. Đặt ống đo vào buồng đo của thiết bị đếm ánh sáng. Bổ sung hỗn hợp luciferin-luciferase. Tiến hành đo và đọc lượng ánh sáng phát ra. Lượng ánh sáng này được biểu thị bằng đơn vị ánh sáng tương đối RLU (Relative Light Unit). Qui đổi lượng RLU thành mật độ tế bào vi sinh vật dựa vào một đường chuẩn thể hiện mối tương quan tuyến tính giữa log(RLU) theo log (CFU/ml) được xác định bằng thực nghiệm (Hình 2.6). Sơ đồ định lượng vi sinh vật bằng ATP được minh họa trên Hình 2 -



Hình 2.7. Quy trình định lượng nhanh vi sinh vật bằng phản ứng phát sáng luciferase-luciferin cần ATP (RLU: Relative Light Unit)

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

- Khảo sát và thu mẫu Đom Đóm

Đom Đóm được khảo sát và thu bắt ở khu vực Cầu Giời TP. Hồ Chí Minh và làm khô bằng P_2O_5 trong chân không trong bình hút ẩm. Lồng đèn ở phần đuôi của Đom Đóm khô được tách ra và giữ ở $-20^\circ C$ cho đến khi dùng.

- Tách chiết và tinh chế sơ bộ luciferase

Một gram lồng đèn khô được nghiền kỹ bằng cối chày sứ trong lạnh trong phút. Bổ sung 20ml acetone lạnh, để yên trong lạnh 30 phút. Dịch chiết bằng acetone được lọc qua giấy lọc không tro. Cặn lọc (bột acetone) chứa luciferase được rửa 2 lần bằng acetone lạnh và làm khô trong bình hút ẩm chân không. Luciferase được chiết từ bột acetone bằng 5ml ammonium sulfate (AS) 10% lạnh. Huyền phù được ly tâm trong lạnh ở 7.000g trong 20 phút. Tủa được rửa với 6ml dung dịch AS 10%, ly tâm tương tự như trên. Dịch trong sau ly tâm được gộp chung lại gọi là dịch chiết thô luciferase. Việc tinh chế sơ bộ luciferase được thực hiện bằng cách tủa phân đoạn bằng các nồng độ bão hòa AS khác nhau (35, 45, 55, 65, 75% bão hòa AS). Các nồng độ bão hòa AS này được thực hiện bằng cách bổ sung bột AS đã được nghiền nhuyễn vào dịch enzyme. Lượng AS cần bổ sung được tính toán theo bảng hướng dẫn pha chế các dung dịch AS ở các nồng độ bão hòa. Tiến hành khuấy đều dung dịch trong khi bổ sung bột AS. Để yên trong lạnh 15 phút. Ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút. Một ml dịch trong được giữ lại để phân tích hoạt tính enzyme, hàm lượng protein, điện di. Phần còn lại được sử dụng cho việc phân đoạn bằng nồng độ bão hòa AS cao hơn. Tủa sau ly tâm được hòa tan bằng 1ml dịch AS 10% để phân tích hoạt tính enzyme và protein.

- Xác định hoạt tính luciferase.

Hoạt tính luciferase của dịch chiết thô và các phân đoạn bão hòa AS được xác định trong 0,2ml hỗn hợp phản ứng chứa 10 μ l dịch enzyme, 7,5nmol luciferin (Sigma), 5 μ mol ATP (Sigma) và dung dịch đệm Tris-succinic 0,1M, pH 7,75 được bổ sung $MgSO_4$ (20mM), EDTA (2mM). Lượng ánh sáng phát ra được đo bằng thiết bị đếm ánh sáng Luminometer TL Luminoscan (Labsystem). Hoạt tính enzyme được biểu diễn một cách tương đối thông qua lượng ánh sáng đo được (RLU) trong điều kiện phản ứng và thiết bị đo nêu trên.

- Phân tích protein

Hàm lượng protein được xác định bằng phương pháp Bradford [8] để hạn chế ảnh hưởng của AS lên kết quả phân tích. Thành phần protein được phân tích bằng điện di trên gel polyacrylamide 12,5% với sự hiện diện của sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). Protein được nhuộm bằng phẩm Coomassie Brilliant Blue 250G.

- Thực hiện phản ứng phát sáng và đo lường ánh sáng phát ra

Hỗn hợp phản ứng phát sáng 200 μ l dung dịch có thành phần gồm 0,1M Tris – succinate pH 7,75, 1mM EDTA, 0,5mM DTT và 0,1% BSA, ATP, MgSO₄, luciferin và luciferase. Các thành phần ATP, MgSO₄, luciferin và luciferase có lượng thay đổi tùy mục đích thí nghiệm. Các thành phần của phản ứng được bổ sung vào ống đo theo thứ tự như sau: dung dịch đệm, EDTA, MgSO₄, luciferin, ATP và cuối cùng là luciferase. Trộn nhanh hỗn hợp bằng máy rung vortex trong vài giây và đặt ngay vào buồng đo. Tiến hành đo và ghi nhận giá trị ánh sáng phát ra (RLU).

- Ly trích ATP từ tế bào và định lượng ATP bằng phản ứng phát sáng

Chuẩn bị huyền phù tế bào *S. typhimurium* (sau khi rửa sạch với nước cất vô trùng) sao cho OD_{610nm} đạt khoảng 0,3. ATP được ly trích bằng cách sử dụng một trong năm chất ly trích B/S Extractant, Dodecyl Trimethyl Ammonium Bromide (n-DTMAB), FL-SAR, ATP Releasing Reagent (ARR) và benzalkonium chloride với nồng độ cuối cùng khác nhau. Hỗn hợp ly trích ATP gồm 200 μ l dung dịch trong một ống Eppendorf gồm: 50 μ l huyền phù tế bào, chất ly trích, bổ sung nước cho đủ 200 μ l. Trộn hỗn hợp bằng máy rung vortex trong 15 giây. Sử dụng 50 μ l dịch ly trích để đo ATP bằng bộ kit đo ATP. Phản ứng phát sáng có thành phần như sau: 110 μ l dung dịch đệm Tris - acetate 0,1M, pH 7,75, 50 μ l dịch trích ATP và 40 μ l dung dịch đo ATP. Tiến hành đo như mô tả ở trên.

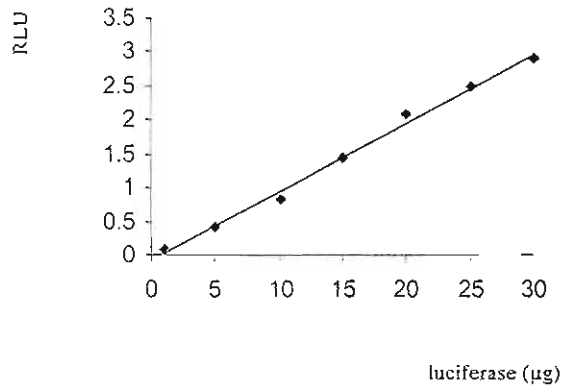
- Khảo sát sự tương quan tuyến tính giữa log(RLU) và log(số tế bào)

Chuẩn bị huyền phù tế bào *S. typhimurium* (sau khi đã rửa sạch với nước cất vô trùng) sao cho OD_{610nm} đạt khoảng 0,1 (khoảng 10⁸ CFU/ml) và 0,3 (khoảng 8x10⁸ CFU/ml). Pha loãng liên tiếp bậc 10 để tạo ra các huyền phù có mật độ 10⁷, 10⁶... và 10⁵ CFU/ml. Lấy 50 μ l các huyền phù tế bào ở mỗi nồng độ cho vào ống đo, thực hiện việc ly trích ATP với chất trích và lượng (nồng độ) thích hợp sao cho tổng dung tích ly trích là 100 μ l. Trộn bằng cách vortex trong 15 giây. Để yên 45 giây. Đặt ống đo vào buồng đo, nạp 100 μ l dung dịch phản ứng phát sáng. Đặt buồng đo, tiến hành đo và ghi nhận giá trị đo được.

- Chuẩn bị dịch luciferase từ Đom Đóm dùng định lượng ATP và định lượng nhanh vi sinh vật

Chuẩn bị bột acetone từ 1g lồng đèn khô đom đóm, chiết luciferase ammonium sulfate (AS) 10% lạnh như trên. Dịch chiết được ly tâm trong lạnh ở 7.000g trong 20 phút. Dịch trong sau ly tâm được rửa bằng một lượng thích hợp bột AS đã nghiền nhuyễn sao cho nồng độ AS bão hòa đạt 45%, khuấy đều dung dịch cho AS tan hoàn toàn, để yên trong lạnh 15 phút. Ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C. Lấy dịch trong bên trên, loại bỏ rửa. Thêm bột AS vào dịch trong này sao cho nồng độ AS bão hòa đạt 65%, khuấy dung dịch cho AS tan hoàn toàn, để yên trong lạnh 15 phút. Ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C. Bỏ dịch trong bên trên, rửa được huyền

phù trở lại với 10% AS. Dung dịch này là dịch luciferase tinh chế không hoàn toàn dùng cho việc định lượng ATP và định lượng nhanh vi sinh vật.



Hình 3.1. Ảnh hưởng của lượng tín hiệu ánh sáng đo được (RLU) và lượng luciferase trong một phản ứng (2µg luciferin; 0,04pg ATP và

- Xác định mật độ tế bào vi khuẩn

mật độ tế bào vi khuẩn *S. typhimurium* (CFU/ml) được xác định bằng phương pháp đổ đĩa trên môi trường thạch dinh dưỡng (0,3% cao thịt, 0,5% pepton, 1,5% agar, pH 6,8).

- Định lượng tế bào *Salmonella typhimurium* bằng phản ứng phát sáng sử dụng luciferase từ Đom Đóm

Chuẩn bị bốn huyền phù tế bào *S. typhimurium* có mật độ $7,2 \times 10^6$; $4,1 \times 10^7$; $2,2 \times 10^8$ và $6,4 \times 10^8$ CFU/ml. Cho 0,45ml huyền phù tế bào vào ống nghiệm (φ 10mm x 200mm), bổ sung 0,05ml EDTA 40mM. Xử lý bằng sóng vi ba và hút 0,1ml dịch đã xử lý để sử dụng vào phản ứng phát sáng. Các thao tác xử lý và đo ánh sáng phát ra được thực hiện tương tự như đã mô tả trong phần ly trích ATP và định lượng ATP phóng thích ở phần trên, trong đó luciferase tinh khiết của Sigma được thay bằng 10µl chế phẩm luciferase phân đoạn tủa 65% bão hòa ammonium sulfate.

IV. KẾT QUẢ

4.1. Khảo sát, thu bắt và định danh Đom Đóm

Việc khảo sát, thu bắt và định danh Đom Đóm được tiến hành vào mùa mưa từ tháng 6 đến tháng 10/1998 tại huyện Cần Giờ, TP.HCM là vùng đất ẩm ướt, nhiều kênh rạch là điều kiện sinh thái thích hợp của Đom Đóm. Một số đặc điểm sinh thái và tập tính của Đom Đóm tại đây được ghi nhận như sau:

- Từ giữa đến cuối mùa mưa (tháng 8 đến tháng 10), tại nhiều nơi ở huyện Cần Giờ hàng ngày Đom Đóm xuất hiện đồng loạt bắt đầu từ chiều tối (khoảng 19g30), mật độ giảm dần đến 23h00.

- Các cá thể Đom Đóm đều đều, mật độ cao, dày đặc trên tán lá cây Đước, mật độ thấp hơn ở tán lá cây Bần. Đặc biệt, quần thể Đom Đóm thường tập trung ở vùng trên cây có chiều cao từ 1 - 4m so với mặt nước, không có mặt ở độ cao thấp hơn 1m và hiện diện rất ít ở độ cao trên 4m.

- Cá thể cái đậu trên là, ít bay, cá thể đực hoạt động hơn, bay lượn tìm cá thể cái để giao phối.

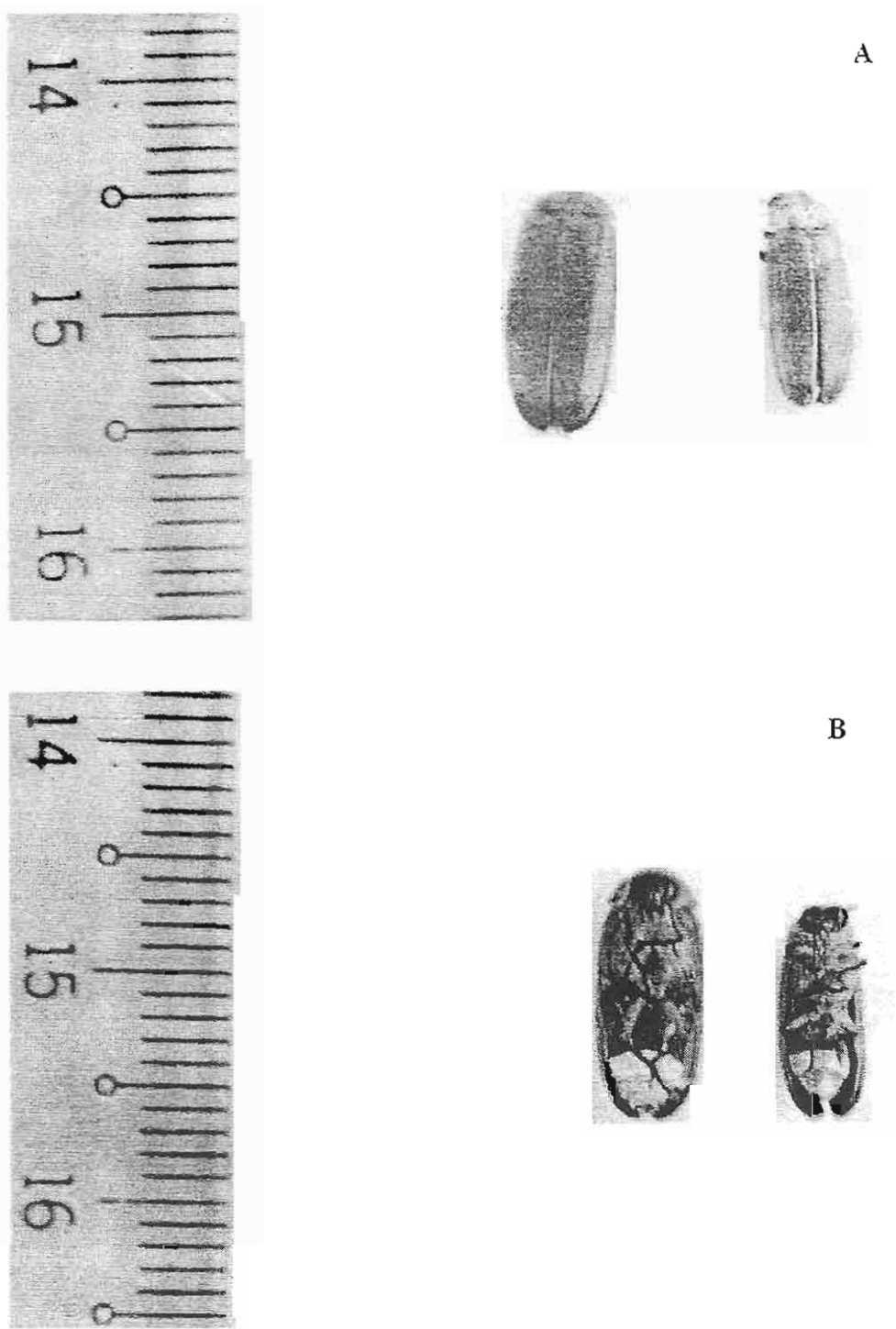
- Đom Đóm cái đẻ trứng vào các khe hẹp ở lớp đất mặt, ẩm ướt nhưng không ngập úng.

- Thức ăn chủ yếu của ấu trùng Đom Đóm là các loài ốc sên nhỏ gặp nhiều trong đất.

Trong ba đợt khảo sát vào thời gian nêu trên, chúng tôi đã thu bắt được hơn 13.000 cá thể. Các cá thể Đom Đóm được quan sát các đặc điểm hình thái ngay tại nơi thu bắt cũng như tại phòng thí nghiệm để tiến hành định danh. Đa số cá thể thu được được làm khô trong bình hút ẩm chân không để thu nhận cơ quan quan phát sáng (lồng đèn).

Hình 4.1 minh họa đặc điểm hình thái của loài Đom Đóm thu nhận ở Cần Giờ. Các cá thể Đom Đóm thu bắt được có kích thước nhỏ, dài 8 - 9mm, rộng 4,4-5mm. Toàn thân có màu vàng chanh, tấm ngực trước lớn có màu vàng sậm hơn, chót cánh cứng hơi phớt đen. Râu hình sợi có 11 đốt; các đốt có thùy bên. Đầu nhỏ màu nâu tối, bị che khuất bởi tấm ngực trước khi nhìn từ phía sau lưng. Mắt kép to ở con đực, nhỏ hơn ở con cái. Cánh trước mỏng, màu vàng nhạt, cụp xuống về phía chót bụng, hai mép không cánh không giáp mí ở đoạn cuối bụng. Phần cuối cánh có màu nâu đen.

Con đực kích thước to hơn con cái. Phần cuối của bụng là cơ quan phát sáng hay lông đèn có màu kem sáng chiếm khoảng 1/3 kích thước bụng.



Hình 4.1. Hình thái Đom Đóm thu bắt tại Cần Giờ TP.HCM

A, Mặt lưng (trái: con đực; phải: con cái); B, Mặt bụng (trái: con đực; phải: con cái)

Trứng Đom Đóm nở thành ấu trùng, sau đó chuyển thành sâu, hóa nhộng và cuối cùng thành cá thể trưởng thành (Hình 4.2).



Hình 4.2 . Biến đổi hình thái trong vòng đời Đom Đóm thu bắt tại Cần Giờ
Từ trung tâm phía dưới theo chiều kim đồng hồ: trứng; ấu trùng ; sâu; nhộng;
Đom Đóm.

Các đặc điểm về hình thái và vòng đời nêu trên cho phép kết luận Đom Đóm thu bắt tại Cần Giờ thuộc loài *Pterotyx malaccaae* vốn hiện diện phổ biến ở các nước Đông Nam Á. Loài này có kích thước nhỏ hơn nhiều so với loài Đom Đóm *Photinus pyralis* ở Bắc Mỹ là loài được nghiên cứu nhiều về sinh học và sinh hóa học của phản ứng phát sáng.

4.2. Tách chiết và tinh chế sơ bộ luciferase từ Đom Đóm

Luciferase từ cơ quan phát sáng của Đom Đóm được thu bắt ở Cần Giờ TP. Hồ Chí Minh được ly trích bằng acetone và bằng dung dịch ammonium sulfate (AS) 10%. Theo Deluca [6], để sử dụng chế phẩm thô này vào việc định lượng ATP và tế bào vi sinh vật, cần tiến hành tinh chế sơ bộ luciferase trong chế phẩm bằng cách tủa phân

đoạn với các nồng độ bão hòa khác nhau của AS. Việc tủa phân đoạn này giúp loại bỏ một số protein tạp và các hợp chất phân tử lượng nhỏ như pyrophosphate, ADP... có tác dụng ức chế hoạt tính luciferase. Khảo sát sự tủa phân đoạn của luciferase ở các nồng độ bão hòa AS như 35, 45, 55, 65 và 75% cho thấy ở nồng độ 35, 45% bão hòa ammonium sulfate trên 75% tổng hoạt tính enzyme vẫn còn ở phân đoạn dịch trong sau ly tâm; khi nồng độ này được tăng lên 55%, khoảng 60% hoạt tính hiện diện trong phân đoạn này được phân bố ở dịch trong, 40% hoạt tính còn lại này đã đi vào phần tủa (Bảng 4.1). Ở nồng độ bão hòa 65% AS, khoảng 75% hoạt tính hiện diện trong phân đoạn này được phát hiện trong phần tủa. Từ kết quả này, chúng tôi đã tiến hành tinh chế sơ bộ luciferase trong dịch chiết thô từ cơ quan phát sáng của Đom Đóm bằng cách tủa phân đoạn bằng hai nồng độ AS bão hòa là 45% và 65% (Bảng 4.2). Khoảng 45% tổng hoạt tính enzyme được thu hồi trong phần tủa của phân đoạn 65% bão hòa AS, với độ sạch tăng 1,45 lần. Trong khi đó, trên 98% tổng hoạt tính luciferase được thu hồi ở phần dịch trong sau ly tâm trong phân đoạn 45% bão hòa AS. Như vậy có sự mất hoạt tính rất mạnh trong quá trình tủa phân đoạn này có thể do sự bất hoạt luciferase khi tiếp xúc với ôxi trong quá trình thí nghiệm. Phân tích bằng điện di trên gel SDS polyacrylamide cho thấy có sự loại bỏ nhiều protein tạp có phân tử lượng khoảng 94, 43, 27kDa (đi vào phần tủa của phân đoạn 45% bão hòa AS), nhưng chế phẩm luciferase trong phần tủa 65% bão hòa AS vẫn còn chứa rất nhiều loại protein khác nhau, do vậy chỉ là chế phẩm tinh chế không hoàn toàn (Hình 4.3).

Bảng 4.1. Phân đoạn luciferase bằng các dung dịch bão hòa ammonium sulfate (AS).

Phân đoạn		Tổng hoạt tính (RLU)	Tổng protein (mg)	Hoạt tính riêng	Độ sạch ^{a)}	Hiệu suất thu hồi (%) ^{b)}
Dịch chiết thô		77,0	30,91	2,49	1	100
35% bão hòa AS	Dịch trong	63,8	14,41	4,43	1,78	82,86
	Tủa	1,2	1,53	0,78	0,31	1,56
45% bão hòa AS	Dịch trong	58,3	14,41	4,05	1,63	75,71
	Tủa	3,0	3,21	0,93	0,37	3,90
55% bão hòa AS	Dịch trong	28,6	13,39	2,14	0,86	37,14
	Tủa	16,6	2,69	6,17	2,48	21,56
65% bão hòa AS	Dịch trong	4,4	5,56	0,79	0,32	5,71
	Tủa	13,9	2,41	5,77	2,32	18,05
75% bão hòa AS	Dịch trong	3,3	10,84	0,30	0,12	4,29
	Tủa	1,1	2,96	0,37	0,15	1,43

^{a)} Hoạt tính riêng tương đối giữa phân đoạn đang xét so với dịch chiết thô ban đầu.

^{b)} Phần trăm tương đối của hoạt tính luciferase trong phân đoạn đang xét so với dịch chiết thô ban đầu.

4.3. Xác định lượng luciferase, luciferin, nồng độ Mg^{2+} trong phản ứng phát sáng

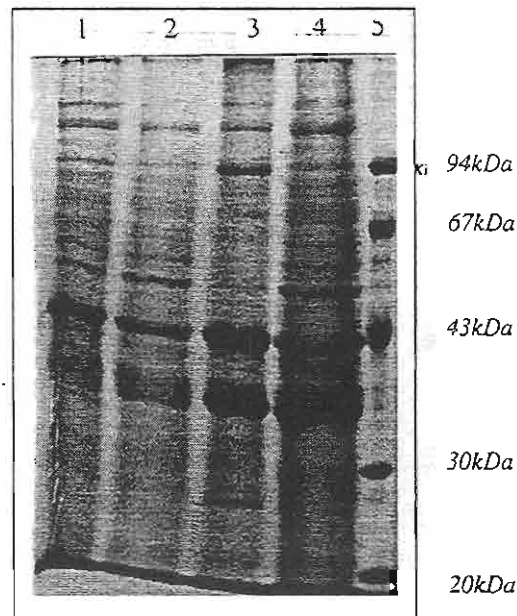
Luciferase, luciferin và Mg^{2+} là các thành phần quan trọng cần được khảo sát về nồng độ tối ưu trong phản ứng phát sáng. Qua khảo sát lượng luciferase cần cho phản ứng, các tác giả nhận thấy lượng ánh sáng phát ra phụ thuộc tuyến tính vào lượng luciferase trong phản ứng trong khoảng từ 1 - 30 μ g (Hình 4.4). Trong các khảo

Bảng 4.2. *Tình chế sơ bộ luciferase bằng dung dịch 45% và 65% bão hòa AS*

Phân đoạn		Tổng hoạt tính (RLU)	Tổng protein (mg)	Hoạt tính riêng	Độ sạch ^{a)}	Hiệu suất thu hồi (%) ^{b)}
Dịch chiết thô		270,6	24,31	11,13	1	100
45% bão hòa AS	Dịch trong	266,2	18,26	14,58	1,31	98,37
	Tủa	2,4	2,04	1,18	0,11	0,89
65% bão hòa AS	Dịch trong	6,6	3,19	2,07	0,19	2,44
	Tủa	120,4	7,68	15,68	1,41	44,49

^{a)} Hoạt tính riêng tương đối giữa phân đoạn đang xét so với dịch chiết thô ban đầu.

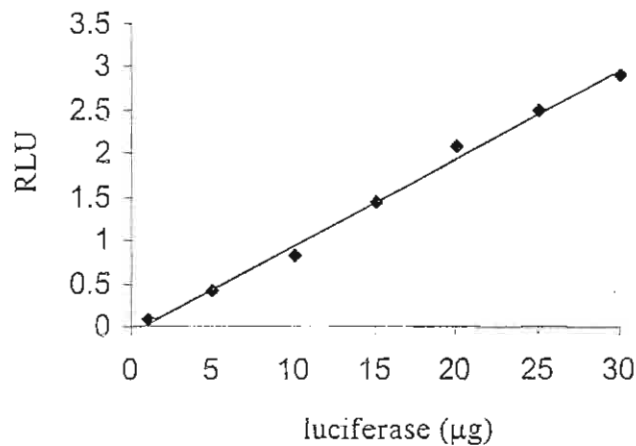
^{b)} Phần trăm tương đối của hoạt tính luciferase trong phân đoạn đang xét so với dịch chiết thô ban đầu.



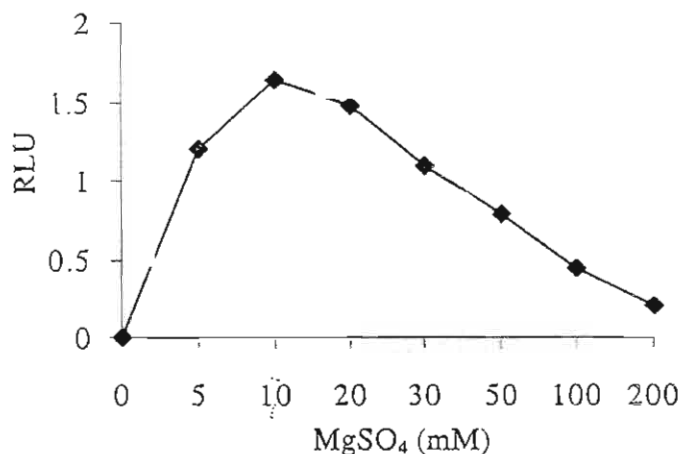
Hình 4.3. Điện di SDS-PAGE.

1, Dịch chiết thô; 2,3, Dịch trong và tủa 45% bão hòa AS; 4, Tủa 65%; 5, Thang phân tử lượng.

sát tiếp theo lượng luciferase được chọn là 5 μ g/phản ứng. Ảnh hưởng của nồng độ Mg^{+2} lên phản ứng phát sáng được khảo sát trong khoảng nồng độ từ 0 – 200mM (Hình 4.5). Nồng độ Mg^{+2} tối ưu cho phản ứng là 10mM. Tiếp theo, ảnh hưởng của lượng luciferin đối với phản ứng phát sáng được khảo sát với lượng luciferin thay đổi từ 2 - 64 μ g/phản ứng với giai số mole ATP được sử dụng từ 10^{-17} – 10^{-13} mole/phản ứng. Kết quả cho thấy ở các trường hợp lượng luciferin dao động trong khoảng



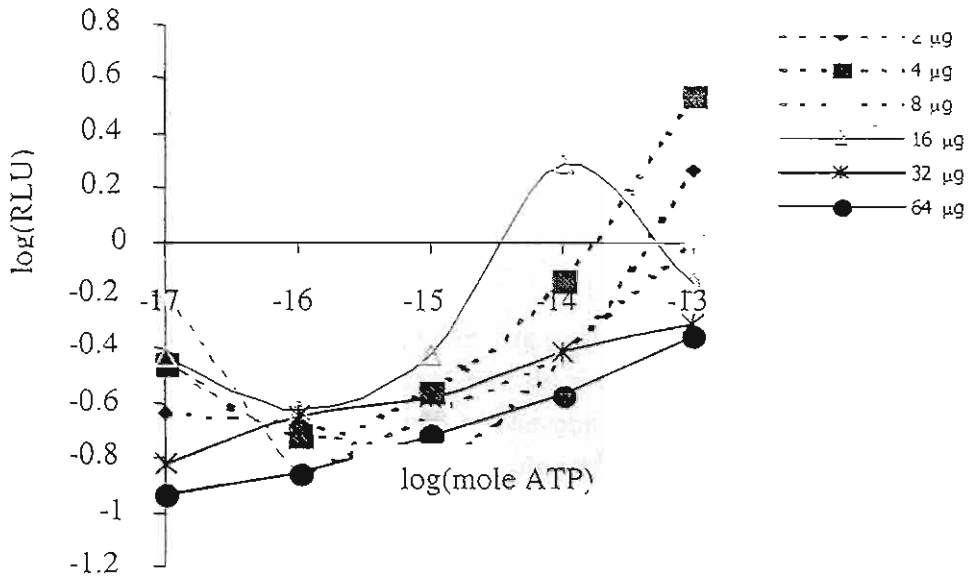
Hình 4.4. Ảnh hưởng của lượng tín hiệu ánh sáng đo được (RLU) và lượng luciferase trong một phản ứng (2 μ g luciferin; 0,04pg ATP và 4 μ mole Mg^{+2})



Hình 4.5. Ảnh hưởng của lượng tín hiệu ánh sáng đo được (RLU) và nồng độ Mg^{+2} trong một phản ứng (5 μ g luciferase; 2 μ g luciferin và 0,04pg ATP)

32 – 64 μ g/phản ứng, có mối tương quan tuyến tính giữa $\log(RLU)$ và $\log(ATP)$ (Hình 4.6). Từ các kết quả thực nghiệm trên có thể xác định thành phần của phản ứng phát

sáng là 5 μ g luciferase/phản ứng, luciferin 32 μ g/phản ứng trong dung dịch đệm có nồng độ Mg⁺² là 10mM. Với thành phần phản ứng này có thể xác định ATP trong khoảng từ 10⁻¹⁷ – 10⁻¹³ moles/phản ứng.



Hình 4.6. Ảnh hưởng của lượng tín hiệu ánh sáng đo được (RLU) và lượng luciferin khác nhau trong phản ứng

4.4. Điều kiện trích ly trích ATP ra khỏi tế bào vi sinh vật

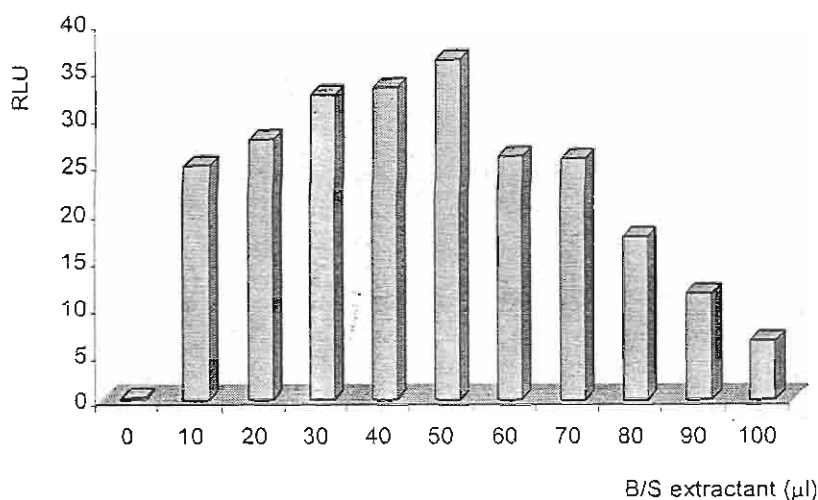
Để ứng dụng phản ứng phát sáng vào định lượng vi sinh vật, cần tìm hoạt chất và nồng độ thích hợp để ly trích ATP từ tế bào vi sinh vật. Yêu cầu của các chất ly trích này là có tác dụng ly trích nhanh ATP ra khỏi tế bào để tham gia vào phản ứng phát sáng.

Trên thế giới, một số chất ly trích được bán ở dạng thương phẩm là B/S Extractant và n-Dodecyl Trimethyl Ammonium Bromide (n-DTMAB) của Biothema AB Inc., ATP Releasing Reagent (ARR) của Labsystems, FL-SAR của Sigma. Các hãng thường giữ bí mật bản chất và nồng của chất ly trích. Tuy nhiên, về lý thuyết, chất ly trích ATP phải là một chất hoạt động bề mặt, có tác dụng làm tan cục bộ hoặc hoàn toàn màng lipid để giải phóng ATP từ tế bào. Mặt khác, các chất hoạt động bề mặt này phải không ức chế phản ứng phát sáng. Từ thông tin trên mạng, chúng tôi được biết một trong những chất hoạt động bề mặt được dùng để ly trích ATP từ tế bào vi sinh vật là benzalkonium chloride. Do vậy, chúng tôi tiến hành khảo sát hiệu quả ly trích ATP từ tế bào vi sinh vật (ở đây sử dụng *S. typhimurium* làm vi sinh vật thử

nghiệm) từ năm loại chất ly trích là B/S extractant, FL-SAR, n-DTMAB, ARR và benzalkonium chloride. Trường hợp chất ly trích FL-SAR, ARR, nhà sản xuất có chỉ dẫn liều lượng sử dụng, còn đối với benzalkonium chloride liều lượng sử dụng trong phản ứng thường được đề cập trong các tài liệu là 0,02% (w/v). Vì vậy, đầu tiên chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của lượng chất ly trích lên mức độ ly trích ATP trong trường hợp của B/S Extractant, n-DTMAB và sau đó so sánh hiệu quả ly trích ATP của năm chất ly trích này.

- Khảo sát lượng chất ly trích B/S Extractant cho hiệu quả ly trích ATP tối ưu

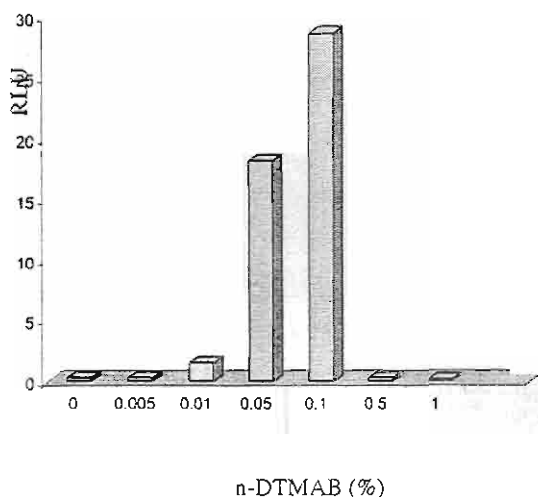
Trong thí nghiệm này, chất ly trích B/S Extractant được sử dụng ở các liều lượng khác nhau (từ 10 - 100 μ l chất ly trích B/S Extractant trong 500 μ l hỗn hợp xử lý, tương đương 2 - 20% dung tích hỗn hợp xử lý) để xử lý huyền phù tế bào vi sinh vật. Sau đó bổ sung các thành phần của phản ứng phát sáng và ghi nhận tín hiệu ánh sáng phát ra. Lượng ATP được ly trích từ tế bào được đánh giá thông qua lượng ánh sáng đo được (RLU) từ cùng một dung tích huyền phù tế bào, trong cùng điều kiện phản ứng phát sáng (các thành phần phản ứng phát sáng như nhau). Kết quả thí nghiệm được trình bày trên *Hình 4.7*. Như vậy, chất ly trích B/S Extractant càng nhiều thì hiệu quả ly trích ATP càng cao. Tuy nhiên, hoạt tính xúc tác của luciferase rất nhạy cảm với các chất hoạt động bề mặt (B/S Extractant là một trong những chất hoạt động bề mặt), nên trong dung dịch phản ứng phát sáng nếu sự hiện diện quá nhiều của các chất này sẽ ức chế phản ứng phát sáng làm tín hiệu ánh sáng phát ra sẽ thấp. Thể hiện trên đồ thị đã cho thấy rõ điều này, ánh sáng phát ra càng thấp khi lượng chất B/S Extractant hiện diện trong dung dịch càng nhiều. Lượng chất ly trích sử dụng là 50 μ l trong 500 μ l (10% dung tích) cho tín hiệu phát sáng cao nhất.



Hình 4.7. So sánh tín hiệu ánh sáng thu được (RLU) theo lượng B/S Extractant dùng trong một phản ứng

- Hiệu quả ly trích ATP từ tế bào của chất ly trích n-DTMAB

Tiến hành xử lý huyền phù tế bào bằng n-DTMAB với các nồng độ cuối cùng trong phản ứng từ 0,005 đến 1% để ly trích ATP. Thực hiện thí nghiệm tương tự trường hợp của B/S Extractant, chúng tôi thu được các kết quả được trình bày trên các Hình 4.8. Kết quả cho thấy, ở nồng độ 0,05 – 0,5% n-DTMAB sẽ cho hiệu quả ly trích tốt nhất. Ở nồng độ 1% hầu như không ghi nhận được tín hiệu phát sáng. Như vậy, ở nồng độ quá cao của n-DTMAB đã xảy ra sự ức chế phản ứng phát sáng.



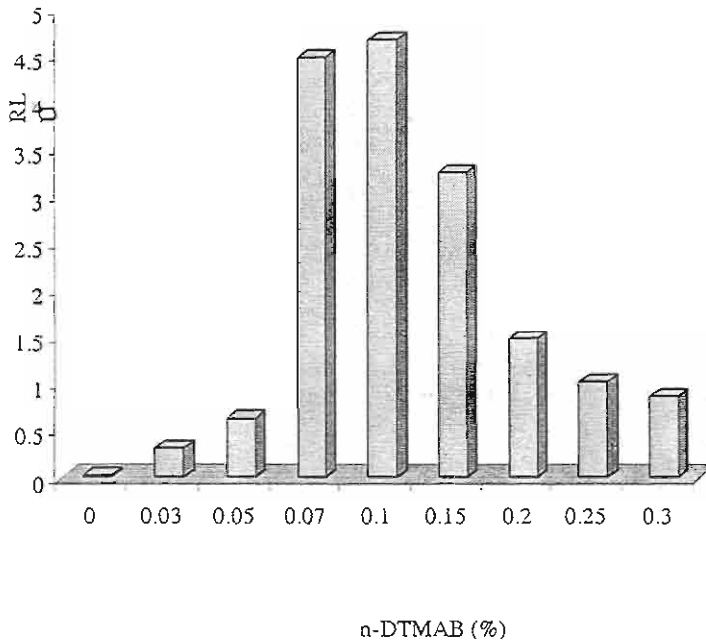
. Hiệu quả ly trích ATP bởi n-DTMAB ở các nồng độ khác nhau

Để xác định nồng độ n-DTMAB thích hợp nhất cho việc ly trích ATP từ tế bào, hiệu quả ly trích ATP của n-DTMAB được khảo sát chi tiết hơn trong dãy nồng độ từ 0,03 đến 0,3% (Hình 4.9). Kết quả cho thấy, nồng độ 0,1% cho hiệu quả ly trích ATP cao nhất. Như vậy có thể kết luận rằng việc xử lý huyền phù tế bào bằng 0,1% n-DTMAB là thích hợp nhất cho việc ly trích ATP từ tế bào.

- So sánh hiệu quả ly trích ATP từ tế bào bởi các chất ly trích khác nhau

Với mục đích tìm ra chất ly trích ATP từ tế bào vi sinh vật có hiệu quả nhất. Chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng ly trích ATP của năm chất B/S Extractant, n-DTMAB, ARR, FL-SAR và benzalkonium chloride (BKC). Đây là các chất thường được sử dụng để ly trích ATP ra khỏi tế bào vi sinh vật dùng trong phản ứng phát sáng sinh học luciferase – luciferin cần ATP. Thực hiện như mô tả trong mục 2.2.2.3 ở phần Vật liệu và Phương pháp, chúng tôi thu được kết quả được trình bày trong Bảng 4.3 và Hình 4.10. Trong năm loại chất trích, BKC cho hiệu quả ly trích ATP tốt nhất. Hiệu quả ly trích cao gấp 1,5 lần so với chất ly trích ATP được thương mại hoá là ARR của hãng Labsystem. Ngược lại, FL-SAR dường như không có hiệu quả trong

việc ly trích ATP từ tế bào vi sinh vật. Như vậy, có thể kết luận rằng, việc xử lý huyền phù tế bào bằng 0,02% (w/v) BKC là thích hợp nhất cho việc ly trích ATP từ tế bào. Do vậy, BKC được sử dụng làm chất ly trích ATP từ tế bào vi sinh vật cho các thí nghiệm tiếp theo.



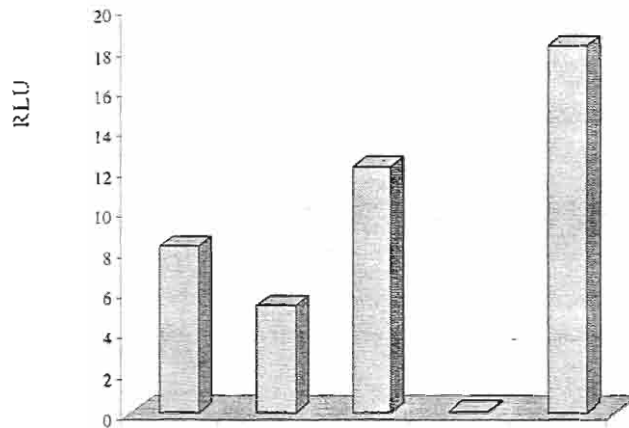
Hình 4.9. Khảo sát nồng độ n-DTMAB tối ưu để ly trích ATP

Bảng 4.3. Hiệu quả ly trích ATP bởi năm loại chất trích khác nhau

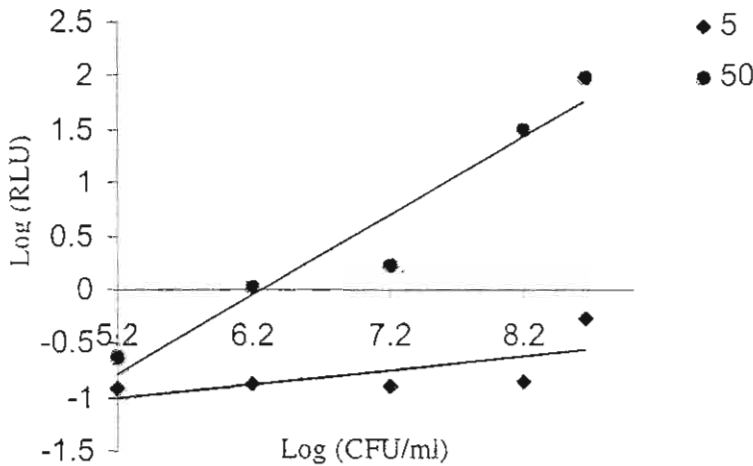
Chất ly trích	Ánh sáng đo được (RLU)
n-DTMAB	8,206
B/S Extractant	5,289
ARR	12,17
FL-SAR	0,066
Benzalkonium chloride (BKC)	18,20

4.5. Xây dựng đường tương quan giữa mật độ tế bào vi sinh vật và lượng ánh sáng phát ra (RLU)

Với 5 μ g luciferase cho một phản ứng tín hiệu ánh sáng đo được rất thấp, vì vậy không có sự tuyến tính giữa mật độ tế bào vi sinh vật và lượng ánh sáng phát ra. Ngược lại, khi lượng luciferase đạt 50 μ g/phản ứng, có sự tương quan tuyến tính giữa lượng ánh sáng phát ra tương ứng với dãy mật độ tế bào vi sinh vật từ $10^5 - 10^9$ CFU/ml (tương đương với $10^4 - 10^8$ tế bào/phản ứng) (Hình 4.11).



Hình 4.10. Hiệu quả ly trích ATP bởi năm loại chất trích khác nhau

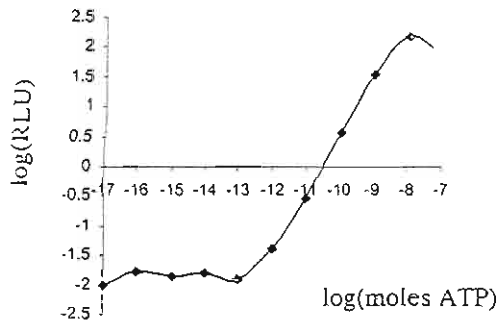


Hình 4.11. Tương quan tuyến tính giữa mật độ tế bào vi sinh vật và lượng ánh sáng đo được

4.6. Định lượng ATP bằng luciferase tách chiết từ Đom Đóm

Do luciferase là thành phần đặc tiên nhất trong phản ứng phát sáng, tác giả đã thử tiến hành ly trích và tinh chế không hoàn toàn luciferase từ Đom Đóm ở Việt Nam. Chế phẩm luciferase thô ở dạng tựa 65% được dùng để thử định lượng ATP bằng cách tìm một dãy hàm lượng của ATP có quan hệ tuyến tính với lượng ánh sáng phát ra. Kết quả trình bày trên Hình 4.12. cho thấy có một tương quan tuyến tính trong vùng ATP từ 10^{-13} moles đến 10^{-8} moles với lượng ánh sáng phát ra. Vậy, có thể

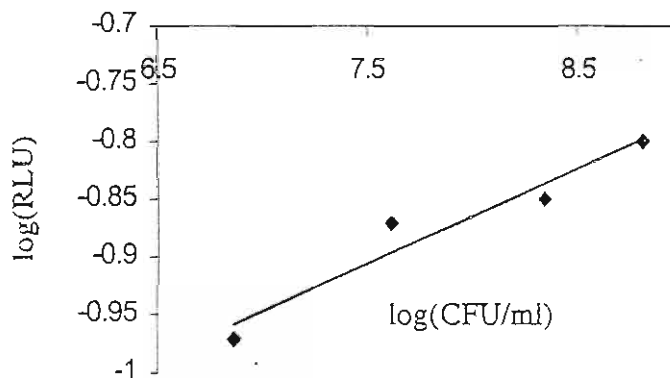
sử dụng luciferase chiết tách từ Đom Đóm để định lượng ATP trong vùng 10^{-13} đến 10^{-8} moles bằng phản ứng phát sáng sinh học.



Hình 4.12. Tương quan giữa lượng ánh sáng đo được và lượng ATP trong hỗn hợp phản ứng phát sáng sử dụng luciferase chiết tách từ Đom Đóm

4.7. Định lượng vi sinh vật bằng phản ứng phát sáng sinh học sử dụng luciferase từ Đom Đóm

Để kiểm tra khả năng sử dụng luciferase được chiết tách từ Đom Đóm vào việc định lượng vi sinh vật, tác giả đã tiến hành đo lượng ánh sáng phát ra từ các dịch ly trích ATP của huyền phù vi khuẩn mật độ khác nhau ($7,2 \times 10^6$; $4,1 \times 10^7$; $2,2 \times 10^8$ và $6,4 \times 10^8$ CFU/ml). Kết quả cho thấy có quan hệ tuyến tính giữa mật độ tế bào [$\log(\text{CFU/ml})$] và lượng ánh sáng phát ra [$\log(\text{RLU})$] (Hình 4.13). Điều này chứng tỏ rằng trong vùng mật độ tế bào đang xét, có thể sử dụng luciferase được chiết tách và tinh chế một phần từ Đom Đóm để xác định nhanh mật độ tế bào vi khuẩn bằng phản ứng phát sáng cần ATP.



Hình 4.13. Tương quan giữa ánh sáng đo được log(RLU) và mật độ tế bào vi sinh vật log(CFU/ml)

V. KẾT LUẬN

Đề tài đã thu được những kết quả thực nghiệm sau đây:

- Đã khảo sát tập tính, đặc điểm sinh thái và định danh Đom Đóm Việt Nam tại huyện Cần Giờ TP.HCM là thuộc loài *Pterotyx malaccae* hiện diện phổ biến ở các nước Đông Nam Á.

- Đã thu bắt khoảng 13.000 cá thể Đom Đóm để thu nhận cơ quan phát sáng làm nguyên liệu để chiết tách và tinh chế sơ bộ luciferase bằng các nồng độ ammonium sulfate bão hòa khác nhau.

- Đã xác định được hàm lượng của các thành phần của phản ứng phát sáng là 5 μ g luciferase/phản ứng, luciferin 32 μ g/phản ứng trong dung dịch đệm có nồng độ Mg^{+2} là 10mM. Với thành phần phản ứng này có thể xác định ATP trong khoảng từ 10^{-17} – 10^{-13} moles/phản ứng.

- Đã khảo sát, so sánh 5 chất ly trích ATP khác nhau là B/S Extractant, n-Dodecyl Trimethyl Ammonium Bromide (n-DMAB), ATP Releasing Reagent (ARR), FL-SAR và benzalkonium chloride và xác định được 0,02% (w/v) benzalkonium chloride là thích hợp nhất cho việc ly trích ATP từ tế bào.

- Có thể định lượng tế bào vi sinh vật bằng phản ứng phát sáng với khoảng đo tuyến tính là 10^5 đến 10^8 tế bào/phản ứng hay tương đương với mật độ tế bào vi sinh vật 10^5 – 10^9 CFU/ml với các thành phần phản ứng trong một phản ứng là 30 μ g luciferase, 32 μ g luciferin, 2 μ mole Mg^{2+} , 0,5mM DTT, 0,1% BSA, 0,1M Tris - succinic pH 7,75.

Như vậy, với mục đích điều chế bộ hóa chất cần cho phản ứng phát sáng sinh học dựa trên hệ thống luciferase – luciferin cần ATP để ứng dụng vào việc định lượng nhanh vi sinh vật, tác giả đã tiến hành khảo sát các điều kiện của phản ứng này và tách chiết, tinh chế không hoàn toàn luciferase từ Đom Đóm Việt Nam. Các kết quả đạt được cho thấy có thể tự phối trộn hai bộ hóa chất dùng cho việc định lượng ATP theo giai hàm lượng là 10^{-17} – 10^{-13} moles ATP/phản ứng và định lượng tế bào vi sinh trong khoảng mật độ từ 10^5 – 10^9 CFU/ml. Ngoài ra, có thể sử dụng chế phẩm luciferase thu được từ phần tủa của phân đoạn 65% bão hòa ammonium sulfate để định lượng ATP ở mức 10^{-13} đến mức 10^{-8} moles và định lượng nhanh vi khuẩn trong vùng mật độ từ 10^7 đến 10^9 CFU/ml. Các kết quả nghiên cứu này bước đầu khẳng định được khả năng ứng dụng của phản ứng phát sáng sinh học dựa trên hệ thống luciferase – luciferin cần ATP vào việc định lượng nhanh vi sinh vật. Sự thành công về việc nghiên cứu, chế tạo bộ hoá chất và chủ động về nguồn enzyme luciferase

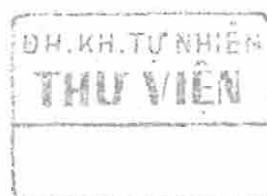
chắc chắn sẽ góp phần đưa phương pháp định lượng nhanh vi sinh vật bằng ATP vào việc giám sát vệ sinh bề mặt các dây chuyền sản xuất chế biến thực phẩm

VI. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hastings J. W., Morin J. G. (1998), Photons for Reporting Molecular Events: Green Fluorescent Protein and Four Luciferase Systems, *In Green Fluorescent Protein: Properties, Applications and Protocols*, Chalfie M., Kain S. Eds., Willey-Liss, NY., pp. 17-41.
2. Hastings J. W. (1998), Bioluminescence, (N. Sperelakis, ed.), *In: Cell Physiology*, 2nd Edition, Academic Press, NY., pp. 984-1000.
3. Leach F. R. (1981), ATP Determination with Firefly Luciferase, *J. Applied Biochemistry* **3**, pp. 473-517.
4. Deluca M. A., McElroy, W. D. Ed., (1986), Bioluminescence and Chemiluminescence, *Methods in Enzymology* **133**, pp. 1-649.
5. Lee K. S., Park H. J., Bae J. S., Goo T. W., Kim I., Sohn H. D., Jin B. R. (2001), Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the luciferase from the firefly, *Pyrocoelia rufa*, *J. Biotechnol* **92**(1), pp. 9-19.
6. Ye L., Buck L. M., Schaeffer H. J., Leach F. R. (1997), Cloning and sequencing of a cDNA for firefly luciferase from *Photuris pennsylvanica*, *Biochimica et Biophysica Acta* **1339**, pp. 39-52.
7. Viviani V. R. (2002), The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases, *Cell Mol. Life Sci.* **59**(11), pp. 1833-1850.
8. Conti E., Franks N. P., Brick P. (1996), Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes, *Structure* **4**(3), pp. 287-298.
9. Ford S. R., Leach F. R. (1998), Bioluminescent Assay of the Adenylate Energy Charge, (LaRossa, R. A., ed., Humana Press Inc., Totowa, NJ). *In Bioluminescence Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* **XX**, pp. 69-82.
10. Timmins G. S., Robb F. J., Wilmot C. M., Jackson S. K. and Swartz H. M. (2001), Firefly flashing is controlled by gating oxygen to light – emitting cells, *J. Experimental Biology* **204**, pp. 2795 – 2801.
11. Branchini B. R., Marschner T. M. and Montemurro (1980), A convenient Affinity Chromatography-Based Purification of Firefly Luciferase, *Analytical Biochemistry* **104**, pp. 386-396.
12. Deluca M. (1976), Firefly luciferase, *Adv. Enzymol.* **44**, pp. 37-67.
13. Deluca M. and McElroy W. D. (1978), Purification and Properties of Firefly Luciferase, (Ed. Deluca M. A.), *In Bioluminescence and Chemiluminescence, Methods in Enzymology* **57**, pp. 3-15.
14. Webster J. J. and Leach F. R. (1980), Optimization of the Firefly Luciferase Assay for ATP, *J. Applied Biochemistry* **2**, pp. 469-479.
15. Henk Vanstaen (1980), Applicability of bioluminescence for rapid detection of viable micro-organisms, *In Bioluminescence for rapid detection of viable micro-organisms, Reprinted from Laboratory Practice* **29**(12), Lumac B. V., Netherlands.

VII. CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI

1. Võ Minh Trí, Trần Linh Thuộc, *Tách chiết luciferase từ Đom đóm và ứng dụng trong định lượng vi sinh vật*, Báo cáo Khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc lần I, Hà Nội, NXB Khoa học Kỹ thuật, 782 - 789, 1999.
2. Võ Minh Trí, Trần Linh Thuộc, *Khảo sát các điều kiện của phản ứng phát sáng sinh học cần ATP để định lượng nhanh vi sinh vật*, Tạp chí phát triển Khoa học và Công nghệ ĐH quốc gia TP.HCM, 5: 13 - 19, 2002.
3. Võ Minh Trí, Trần Linh Thuộc, *Tạo dòng sản xuất luciferase tái tổ hợp dùng cho phản ứng phát sáng sinh học in vitro*, Tạp chí phát triển Khoa học và Công nghệ ĐH quốc gia TP.HCM, 5: 144 - 50, 2002.
4. Võ Minh Trí, *Nghiên cứu sử dụng phản ứng phát sáng sinh học cần ATP ở đom đóm vào định lượng nhanh vi sinh vật*, Luận văn tác sĩ Sinh học, Trường ĐH Khoa học tự nhiên, 2003.



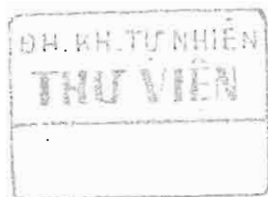
ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP. HCM
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

BÁO CÁO NGHIÊM THU
ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC CẤP BỘ

TÊN ĐỀ TÀI:

**NGHIÊN CỨU LUCIFERASE CỦA ĐOM
ĐÓM VÀ ỨNG DỤNG TRONG ĐỊNH
LƯỢNG VI SINH VẬT BẰNG ATP**

Mã số: B98-18-37



Chủ nhiệm: **TS. TRẦN LINH THUỐC**

Thời gian thực hiện: **06/1998 - 06/1999**

I. MỤC TIÊU VÀ NỘI DUNG

Bệnh gây ra bởi thực phẩm luôn là mối lo ngại của các nhà sản xuất, chế biến thực phẩm, của các cơ quan quản lý vệ sinh thực phẩm và của người tiêu dùng. Vi sinh vật là nguyên nhân quan trọng nhất trong gây bệnh do thực phẩm. Giám sát vệ sinh bề mặt (thiết bị, dụng cụ... của dây chuyền sản xuất) là yêu cầu rất quan trọng trong sản xuất và chế biến thực phẩm. Việc giám sát này có thể được thực hiện thông qua xác định mật độ tổng vi sinh vật hiện diện trên một diện tích bề mặt. Để kiểm tra mật độ tổng vi sinh vật này, phương pháp thông dụng là đếm số khuẩn lạc. Tuy nhiên, hiện nay phương pháp định lượng tổng vi sinh vật thông qua định lượng ATP trong tế bào vi sinh vật bằng phản ứng phát sáng sinh học luciferin-luciferasae khi có sự hiện diện của ion Mg^{2+} và cần ATP ngày càng trở nên phổ biến. Phương pháp này được dựa trên nguyên tắc là tất cả tế bào sinh vật sống đều chứa một lượng ATP tương đối ổn định; nhờ vậy, có thể định lượng vi sinh vật bằng trị số ATP dựa trên một đường chuẩn thể hiện mối tương quan tuyến tính giữa lượng ATP đo được và mật độ tế bào vi sinh vật. Ưu điểm của phương pháp này là dễ thực hiện, độ nhạy cao và có thể xác định một cách chính xác mật độ vi sinh vật chỉ trong vài phút.

Đề tài này nhằm xây dựng cơ sở cho việc ứng dụng phản ứng phát sáng của Đom Đóm để định lượng nhanh vi sinh vật phục vụ cho nhu cầu thực tiễn về giám sát vệ sinh trong sản xuất và chế biến thực phẩm tại Việt Nam. Nội dung của đề tài bao gồm việc khảo sát về loài Đom Đóm ở Cần Giờ TP.HCM, tách chiết, tinh chế sơ bộ luciferase, khảo sát các điều kiện của phản ứng phát sáng sử dụng nguồn enzyme này làm cơ sở cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo như phát triển bộ hóa chất dùng để định lượng ATP và định lượng nhanh vi sinh vật.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

- Đom Đóm được khảo sát và thu bắt ở khu vực Cần Giờ TP. Hồ Chí Minh và làm khô bằng P_2O_5 trong chân không trong bình hút ẩm. Lồng đèn ở phần đuôi của Đom Đóm khô được tách ra và giữ ở $20^\circ C$ cho đến khi dùng.

- Luciferase được tách chiết bằng acetone và tinh chế sơ bộ luciferase bằng ammonium sulfate theo qui trình của Deluca M. McElroy W. D. (*Methods in Enzymology* 57, 3-15, 1978).

- Hoạt tính luciferase của dịch chiết thô và các phân đoạn bão hòa AS được xác định trong 0,2ml hỗn hợp phản ứng chứa 10 μ l dịch enzyme, 7,5nmol luciferin (Sigma), 5 μ mol ATP (Sigma) và dung dịch đệm Tris-succinic 0,1M, pH 7,75 được bổ sung MgSO₄ (20mM), EDTA (2mM). Lượng ánh sáng phát ra được đo bằng thiết bị đếm ánh sáng Luminometer TL Luminoscan (Labsystem). Hoạt tính enzyme được biểu diễn một cách tương đối thông qua lượng ánh sáng đo được (RLU).

- Hàm lượng protein được xác định bằng phương pháp Bradford để hạn chế ảnh hưởng của AS lên kết quả phân tích. Thành phần protein được phân tích bằng điện di trên gel polyacrylamide 12,5% với sự hiện diện của sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). Protein được nhuộm bằng phẩm Coomassie Brilliant Blue 250G.

- Phản ứng phát sáng được thực hiện trong 200 μ l dung dịch chứa 0,1M Tris – succinate pH 7,75, 1mM EDTA, 0,5mM DTT và 0,1% BSA, ATP, MgSO₄, luciferin và luciferase. Các thành phần ATP, MgSO₄, luciferin và luciferase có lượng thay đổi tùy mục đích thí nghiệm.

- ATP được ly trích bằng 4 chất ly trích thương mại là B/S Extractant, Dodecyl Trimethyl Ammonium Bromide (n-DTMAB), FL-SAR, ATP Releasing Reagent (ARR) và 1 hợp chất thường sử dụng trong các phòng thí nghiệm là benzalkonium chloride. Hỗn hợp ly trích ATP gồm 200 μ l dung dịch trong một ống Eppendorf gồm: 50 μ l huyền phù tế bào, chất ly trích, bổ sung nước cho đủ 200 μ l. Trộn hỗn hợp bằng máy rung vortex trong 15 giây. Sử dụng 50 μ l dịch ly trích để đo ATP bằng bộ kit đo ATP.

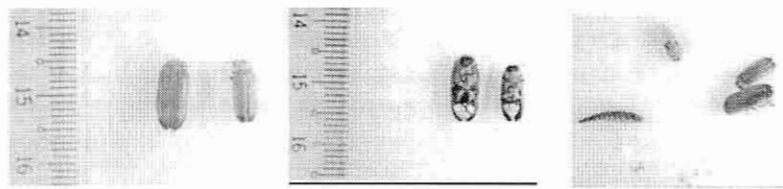
- Mật độ tế bào huyền phù vi khuẩn *S. typhimurium* dùng trong thí nghiệm được xác định bằng phương pháp đổ đĩa trên môi trường thạch dinh dưỡng (0,3% cao thịt, 0,5% pepton, 1,5% agar, pH 6,8).

- Định lượng tế bào *Salmonella typhimurium* bằng phản ứng phát sáng sử dụng luciferase từ Đom Đóm: chuẩn bị bốn huyền phù tế bào *S. typhimurium* có mật độ $7,2 \times 10^6$; $4,1 \times 10^7$; $2,2 \times 10^8$ và $6,4 \times 10^8$ CFU/ml. Cho 0,45ml huyền phù tế bào vào ống nghiệm (ϕ 10mm x 200mm), bổ sung 0,05ml EDTA 40mM. Xử lý bằng sóng vi ba và hút 0,1ml dịch đã xử lý để sử dụng vào phản ứng phát sáng sử dụng 10 μ l chế phẩm luciferase phân đoạn tủa 65% bão hòa ammonium sulfate.

III. KẾT QUẢ

3.1. Khảo sát, thu bắt và định danh Đom Đóm

Việc khảo sát, thu bắt và định danh Đom Đóm được tiến hành vào mùa mưa từ tháng 6 đến tháng 10/1998 tại huyện Cần Giờ, TP.HCM. Một số đặc điểm sinh thái và tập tính của Đom Đóm đã được ghi nhận. Trong ba đợt khảo sát đã thu bắt được hơn 13.000 cá thể. Các cá thể Đom Đóm được quan sát các đặc điểm hình thái ngay tại nơi thu bắt cũng như tại phòng thí nghiệm để tiến hành định danh. Đa số cá thể thu được được làm khô trong bình hút ẩm chân không để thu nhận cơ quan phát sáng (lông đèn). Đom Đóm thu được có kích thước nhỏ, dài 8 - 9mm, rộng 4 - 4,5mm, có đặc điểm hình thái và vòng đời đặc trưng của loài *Pterotyx malacca* vốn hiện diện phổ biến ở các nước Đông Nam Á.



Hình: Hình thái và vòng đời của Đom Đóm *Pterotyx malacca* tại huyện Cần Giờ TP.HCM

3.2. Tách chiết và tinh chế sơ bộ luciferase từ Đom Đóm

Luciferase từ cơ quan phát sáng của Đom Đóm được thu bắt ở Cần Giờ TP. Hồ Chí Minh được ly trích bằng acetone, dung dịch ammonium sulfate (AS) 10% và được tinh chế sơ bộ bằng cách tủa phân đoạn bằng các nồng độ 45 và 65% AS bão hòa. Khoảng 45%

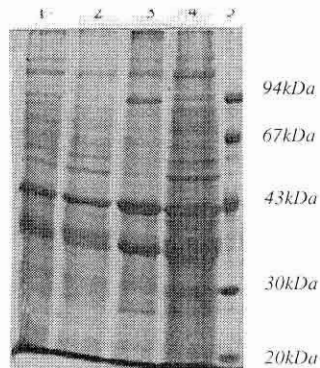
tổng hoạt tính enzyme được thu hồi trong phần tủa của phân đoạn 65% bão hòa AS, với độ sạch tăng 1,45 lần. Trong khi đó, trên 98% tổng hoạt tính luciferase được thu hồi ở phần dịch trong sau ly tâm trong phân đoạn 45% bão hòa AS.

Bảng 1. *Tinh chế sơ bộ luciferase bằng dung dịch 45% và 65% bão hòa AS*

Phân đoạn		Tổng hoạt tính (RLU)	Tổng protein (mg)	Hoạt tính riêng	Độ sạch ^{a)}	Hiệu suất thu hồi (%) ^{b)}
Dịch chiết thô		270,6	24,31	11,13	1	100
45% bão hòa AS	Dịch trong	266,2	18,26	14,58	1,31	98,37
	Tủa	2,4	2,04	1,18	0,11	0,89
65% bão hòa AS	Dịch trong	6,6	3,19	2,07	0,19	2,44
	Tủa	120,4	7,68	15,68	1,41	44,49

^{a)} Hoạt tính riêng tương đối giữa phân đoạn đang xét so với dịch chiết thô ban đầu; ^{b)} Phần trăm tương đối của hoạt tính luciferase trong phân đoạn đang xét so với dịch chiết thô ban đầu.

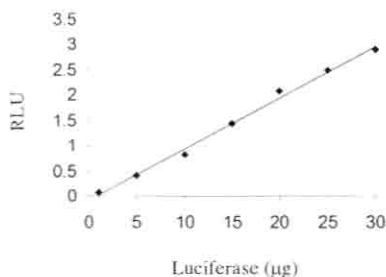
Như vậy có sự mất hoạt tính rất mạnh trong quá trình tủa phân đoạn này có thể do sự bất hoạt luciferase khi tiếp xúc với ôxi trong quá trình thí nghiệm. Phân tích bằng điện di trên gel SDS polyacrylamide cho thấy có sự loại bỏ nhiều protein tạp có phân tử lượng khoảng 94, 43, 27kDa (đi vào phần tủa của phân đoạn 45% bão hòa AS), nhưng chế phẩm luciferase trong phần tủa 65% bão hòa AS vẫn còn chứa rất nhiều loại protein khác nhau, do vậy chỉ là chế phẩm tinh chế không hoàn toàn.



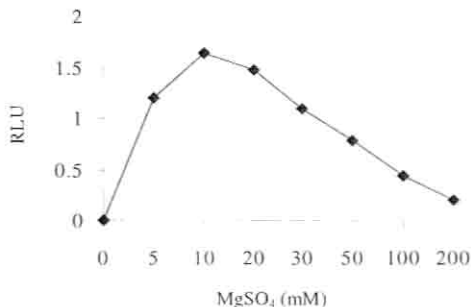
Hình 2. Điện di SDS-PAGE. 1, Dịch chiết thô; 2,3, Dịch trong và tủa 45% bão hòa AS; 4, Tủa 65%; 5, Thang phân tử lượng.

3.3. Xác định lượng luciferase, luciferin, nồng độ Mg^{2+} trong phản ứng phát sáng

Luciferase, luciferin và Mg^{2+} là các thành phần quan trọng cần được khảo sát về nồng độ tối ưu trong phản ứng phát sáng. Kết quả khảo sát cho thấy lượng ánh sáng phát ra phụ thuộc tuyến tính vào lượng luciferase trong phản ứng trong khoảng từ 1 - 30 μ g (Hình 3). Trong các khảo sát tiếp theo lượng luciferase được chọn là 5 μ g/phản ứng. Nồng độ Mg^{2+} tối ưu cho phản ứng là 10mM (Hình 4). Khi lượng luciferin dao động trong khoảng 32 - 64 μ g/phản ứng thì có mối tương quan tuyến tính giữa log(RLU) và log(ATP) (Hình 5). Thành phần của phản ứng phát sáng đã được xác định là 5 μ g luciferase/phản ứng, luciferin 32 μ g/phản ứng trong dung dịch đệm có nồng độ Mg^{2+} là 10mM. Với thành phần phản ứng này có thể xác định ATP trong khoảng từ 10^{-17} - 10^{-13} moles/phản ứng.



Hình 3. Ảnh hưởng của lượng tín hiệu ánh sáng đo được (RLU) và lượng luciferase trong một phản ứng (2 μ g luciferin; 0,04pg ATP và 4 μ mole Mg^{+2})

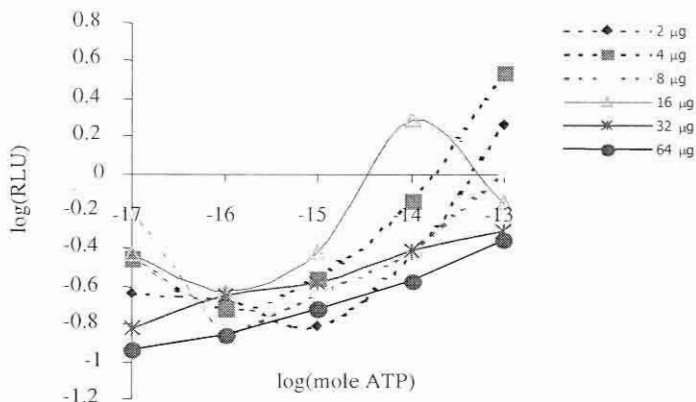


Hình 4. Ảnh hưởng của lượng tín hiệu ánh sáng đo được (RLU) và nồng độ Mg^{+2} trong một phản ứng (5 μ g luciferase; 2 μ g luciferin và 0,04pg ATP)

3.4. Điều kiện trích ly trích ATP ra khỏi tế bào vi sinh vật

Với mục đích tìm ra chất ly trích ATP từ tế bào vi sinh vật có hiệu quả nhất, chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng ly trích ATP của năm chất B/S Extractant, n-DTMAB, ARR, FL-SAR và benzal

konium chloride (BKC). Đây là các chất thường được sử dụng để ly trích ATP ra khỏi tế bào vi sinh vật dùng trong phản ứng phát sáng.



Hình 5. Ảnh hưởng của lượng tín hiệu ánh sáng đo được (RLU) và lượng luciferin khác nhau trong phản ứng

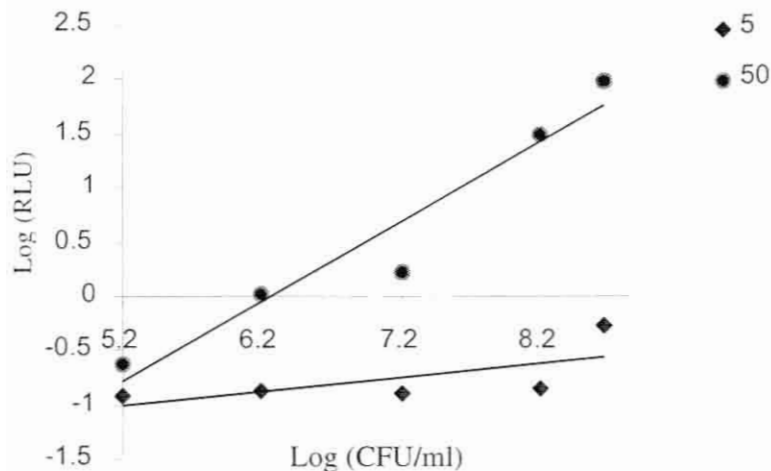
Trong năm loại chất trích, BKC cho hiệu quả ly trích ATP tốt nhất (Bảng 2). Hiệu quả ly trích này cao gấp 1,5 lần so với chất ly trích ATP được thương mại hoá là ARR của hãng Labsystem. Ngược lại, FL-SAR dường như không có hiệu quả trong việc ly trích ATP từ tế bào vi sinh vật. Như vậy, có thể kết luận rằng, việc xử lý huyền phù tế bào bằng 0,02% (w/v) BKC là thích hợp nhất cho việc ly trích ATP từ tế bào. Do vậy, BKC được sử dụng làm chất ly trích ATP từ tế bào vi sinh vật cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 2. Hiệu quả ly trích ATP bởi năm loại chất trích khác nhau

Chất ly trích	Ánh sáng đo được (RLU)
n-DTMAB	8,206
B/S Extractant	5,289
ARR	12,17
FL-SAR	0,066
Benzalkonium chloride (BKC)	18,20

3.5. Xây dựng đường tương quan giữa mật độ tế bào vi sinh vật và lượng ánh sáng phát ra (RLU)

Với 5µg luciferase cho một phản ứng tín hiệu ánh sáng đo được rất thấp, vì vậy không có sự tuyến tính giữa mật độ tế bào vi sinh vật và lượng ánh sáng phát ra. Ngược lại, khi lượng luciferase đạt 50µg/phản ứng, có sự tương quan tuyến tính giữa lượng ánh sáng phát ra tương ứng với dãy mật độ tế bào vi sinh vật từ $10^5 - 10^9$ CFU/ml (tương đương với $10^4 - 10^8$ tế bào/phản ứng) (Hình 6).

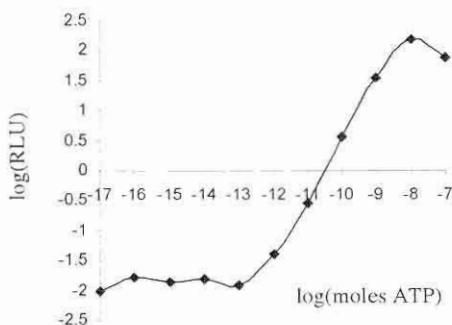


Hình 6. Tương quan tuyến tính giữa mật độ tế bào vi sinh vật và lượng ánh sáng đo được

3.6. Định lượng ATP bằng luciferase tách chiết từ Đom Đóm

Do luciferase là thành phần đặc tiên nhất trong phản ứng phát sáng, tác giả đã thử tiến hành ly trích và tinh chế không hoàn toàn luciferase từ Đom Đóm ở Việt Nam. Chế phẩm luciferase thô ở dạng tủa 65% được dùng để thử định lượng ATP bằng cách tìm một dãy hàm lượng của ATP có quan hệ tuyến tính với lượng ánh sáng phát ra. Kết quả trình bày trên Hình 7, cho thấy có một tương quan tuyến

tính trong vùng ATP từ 10^{-13} moles đến 10^{-8} moles với lượng ánh sáng phát ra. Vậy, có thể sử dụng luciferase chiết tách từ Đom Đóm để định lượng ATP trong vùng 10^{-13} đến 10^{-8} moles bằng phản ứng phát sáng sinh học.



Hình 7. Tương quan giữa lượng ánh sáng đo được và lượng ATP trong hỗn hợp phản ứng phát sáng sử dụng luciferase

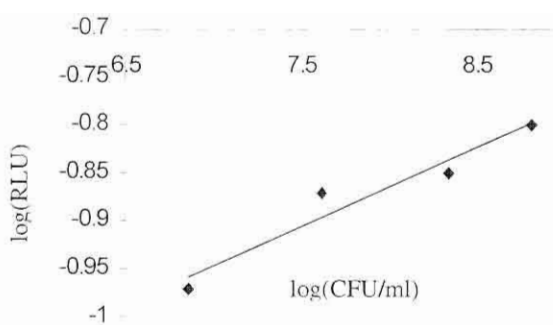
3.7. Định lượng vi sinh vật bằng phản ứng phát sáng sinh học sử dụng luciferase từ Đom Đóm

Để kiểm tra khả năng sử dụng luciferase được chiết tách từ Đom Đóm vào việc định lượng vi sinh vật, tác giả đã tiến hành đo lượng ánh sáng phát ra từ các dịch ly trích ATP của huyền phù vi khuẩn mật độ khác nhau ($7,2 \times 10^6$; $4,1 \times 10^7$; $2,2 \times 10^8$ và $6,4 \times 10^8$ CFU/ml). Kết quả cho thấy có quan hệ tuyến tính giữa mật độ tế bào [$\log(\text{CFU/ml})$] và lượng ánh sáng phát ra [$\log(\text{RLU})$] (Hình 8). Điều này chứng tỏ rằng trong vùng mật độ tế bào đang xét, có thể sử dụng luciferase được chiết tách và tinh chế một phần từ Đom Đóm để xác định nhanh mật độ tế bào vi khuẩn bằng phản ứng phát sáng cần ATP.

IV. KẾT LUẬN

Đề tài đã thu được những kết quả thực nghiệm sau đây:

- Đã khảo sát tập tính, đặc điểm sinh thái và định danh Đom Đóm Việt Nam tại huyện Cần Giờ TP.HCM là thuộc loài *Pterotyx malacca* hiện diện phổ biến ở các nước Đông Nam Á.



Hình 8. Tương quan giữa ánh sáng đo được $\log(RLU)$ và mật độ tế bào vi sinh vật $\log(CFU/ml)$

- Đã thu bắt khoảng 13.000 cá thể Đom Đóm để thu nhận cơ quan phát sáng làm nguyên liệu để chiết tách và tinh chế sơ bộ luciferase bằng các nồng độ ammonium sulfate bão hòa khác nhau.

- Đã xác định được hàm lượng của các thành phần của phản ứng phát sáng là $5\mu g$ luciferase/phản ứng, luciferin $32\mu g$ /phản ứng trong dung dịch đệm có nồng độ Mg^{+2} là 10mM. Với thành phần phản ứng này có thể xác định ATP trong khoảng từ 10^{-17} – 10^{-13} moles/phản ứng.

- Đã khảo sát, so sánh 5 chất ly trích ATP khác nhau là B/S Extractant, n-Dodecyl Trimethyl Ammonium Bromide (n-DTMAB), ATP Releasing Reagent (ARR), FL-SAR và benzalkonium chloride và xác định được 0,02% (w/v) benzalkonium chloride là thích hợp nhất cho việc ly trích ATP từ tế bào.

- Có thể định lượng tế bào vi sinh vật bằng phản ứng phát sáng với khoảng đo tuyến tính là 10^5 đến 10^8 tế bào/phản ứng hay tương đương với mật độ tế bào vi sinh vật 10^5 – 10^9 CFU/ml với các thành phần phản ứng trong một phản ứng là $30\mu g$ luciferase, $32\mu g$ luciferin, $2\mu mole Mg^{2+}$, 0,5mM DTT, 0,1% BSA, 0,1M Tris - succinic pH 7,75.

Với mục đích tạo cơ sở cho việc phát triển bộ hóa chất cần cho phản ứng phát sáng sinh học dựa trên hệ thống luciferase – luciferin cần ATP để ứng dụng vào việc định lượng nhanh vi sinh vật, đề tài

đã tiến hành khảo sát các điều kiện của phản ứng này và tách chiết, tinh chế không hoàn toàn luciferase từ Đom Đóm Việt Nam. Các kết quả đạt được cho thấy có thể phát triển bộ hóa chất dùng cho việc định lượng ATP theo giai hàm lượng là 10^{-17} - 10^{-13} moles ATP/phản ứng và định lượng tế bào vi sinh trong khoảng mật độ từ 10^5 - 10^9 CFU/ml. Ngoài ra, có thể sử dụng chế phẩm luciferase thu được từ phần tủa của phân đoạn 65% bão hòa ammonium sulfate để định lượng ATP ở mức 10^{-13} đến mức 10^{-8} moles và định lượng nhanh vi khuẩn trong vùng mật độ từ 10^7 đến 10^9 CFU/ml. Các kết quả nghiên cứu này bước đầu khẳng định được khả năng ứng dụng của phản ứng phát sáng sinh học dựa trên hệ thống luciferase - luciferin cần ATP của Đom Đóm vào việc định lượng nhanh vi sinh vật.

VII. CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI

1. Võ Minh Trí, Trần Linh Thuộc, *Tách chiết luciferase từ Đom đóm và ứng dụng trong định lượng vi sinh vật*, Báo cáo Khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc lần I, Hà Nội, NXB Khoa học Kỹ thuật, 782 - 789, 1999.
2. Võ Minh Trí, Trần Linh Thuộc, *Khảo sát các điều kiện của phản ứng phát sáng sinh học cần ATP để định lượng nhanh vi sinh vật*, Tạp chí phát triển Khoa học và Công nghệ ĐH quốc gia TP.HCM, 5: 13 - 19, 2002.
3. Võ Minh Trí, Trần Linh Thuộc, *Tạo dòng sản xuất luciferase tái tổ hợp dùng cho phản ứng phát sáng sinh học in vitro*, Tạp chí phát triển Khoa học và Công nghệ ĐH quốc gia TP.HCM, 5: 144 - 50, 2002.
4. Võ Minh Trí, *Nghiên cứu sử dụng phản ứng phát sáng sinh học cần ATP ở đom đóm vào định lượng nhanh vi sinh vật*, Luận văn ^{ti} tác sĩ Sinh học, Trường ĐH Khoa học tự nhiên, 2003.

