

KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN CỦA PHẢN ỨNG PHÁT SÁNG SINH HỌC CẦN ATP ĐỂ ĐỊNH LƯỢNG NHANH VI SINH VẬT

Võ Minh Trí, Trần Linh Thuộc

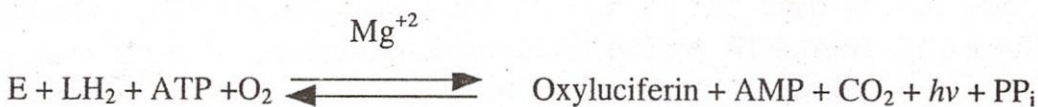
Khoa Sinh học - Trường ĐH Khoa học Tự nhiên - ĐH Quốc gia TP.HCM

(Bài nhận ngày 14 tháng 3 năm 2002)

TÓM TẮT: Các điều kiện cần thiết cho phản ứng phát sáng sinh học dựa trên hệ thống luciferase - luciferin cần ATP đã được khảo sát. Nồng độ cuối cùng của Mg^{2+} ở 10mM là thích hợp. Sử dụng 5 μ g luciferase và 32 μ g luciferin cho một phản ứng cho phép định lượng được lượng ATP trong khoảng 10^{-17} - 10^{-13} moles. Tuy nhiên, mật độ tế bào vi khuẩn trong khoảng 10^5 - 10^9 CFU/ml chỉ được xác định khi lượng luciferase là 50 μ g và luciferin 32 μ g cho mỗi phản ứng. Chất hoạt động bề mặt ARR thích hợp nhất cho việc ly trích ATP. Sử dụng dịch chiết phân đoạn luciferase từ lòng đèn đom đóm được tủa bằng 65% ammonium sulfate bão hòa đã xác định được một mối quan hệ tuyến tính giữa lượng ATP trong khoảng 10^{-13} - 10^{-8} moles hoặc mật độ tế bào vi khuẩn trong khoảng 10^7 - 10^9 CFU/ml với lượng ánh sáng phát ra. Các kết quả thu được chứng tỏ khả năng sử dụng chế phẩm luciferase này để định lượng ATP hoặc mật độ vi khuẩn trong vùng tương ứng.

MỞ ĐẦU

Để định lượng vi sinh vật, các phương pháp truyền thống thường được sử dụng là đếm trực tiếp dưới kính hiển vi, đếm khuẩn lạc, MPN (most probable number), màng lọc... Các phương pháp này có nhược điểm là cần biết kỹ thuật vi sinh vật học, sai số cao do chỉ xác định được một bộ phận nhất định trong số vi sinh vật thực tế hiện diện, kết quả phụ thuộc vào môi trường sử dụng và điều kiện nuôi cấy, không phân biệt được tế bào sống và tế bào chết, cần thời gian dài từ một đến vài ngày mới cho kết quả. Để khắc phục nhược điểm chậm cho kết quả của các phương pháp trên, nhiều phương pháp định lượng vi sinh vật cho kết quả nhanh hơn đã được nghiên cứu và sử dụng [1]. Một trong các phương pháp được sử dụng nhiều là phương pháp đo ATP (adenosine triphosphate) dựa trên phản ứng phát sáng sinh học của phản ứng oxy hóa luciferin được xúc tác bởi enzyme luciferase cần ATP ở Đom Đóm như sau:



(E : luciferase, LH_2 : luciferin)

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, phương pháp này được ứng dụng nhiều để giám sát vệ sinh bề mặt thiết bị, không gian trong các dây chuyền sản xuất và chế biến thực phẩm, làm công cụ để giám sát các mối nguy gây nhiễm thông qua tiếp xúc bề mặt trong chương trình HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) [3].

Tại Việt Nam, nhằm nâng cao hiệu quả trong việc giám sát, kiểm tra vệ sinh bề mặt các thiết bị, nhà xưởng sản xuất chế biến thực phẩm, lên men công nghiệp... cũng như độ an toàn về mặt vi sinh của nguyên liệu, bán thành phẩm và thành phẩm, việc áp dụng phương pháp định lượng nhanh vi sinh vật bằng phản ứng phát sáng dựa vào ATP đã trở thành yêu cầu thực tiễn. Tuy nhiên, hạn chế lớn nhất của phương pháp này khi được sử dụng tại Việt Nam là cần có thiết bị đo ánh sáng và hóa chất đắt tiền. Vì vậy, việc nghiên cứu chế tạo thiết bị và hóa chất trong nước để thay thế cho ngoại nhập là một trong các biện pháp giảm chi phí và giá thành tạo điều kiện thúc đẩy sự áp dụng rộng rãi của phương pháp tại Việt Nam. Trong bài báo này, tác giả trình bày một số kết quả trong việc xác định nồng độ các thành phần chính của phản ứng phát sáng và nghiên cứu sử dụng luciferase tinh chế không hoàn toàn từ Đom Đóm vào việc định lượng nhanh vi sinh vật nhằm tạo cơ sở cho việc điều chế bộ hóa chất cần cho phương pháp định lượng nhanh vi sinh vật bằng phản ứng phát sáng sinh học cần ATP.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Giống vi sinh vật: các thí nghiệm ly trích ATP từ tế bào vi sinh vật và xác định tương quan giữa lượng ánh sáng phát ra và số lượng tế bào vi sinh vật được thực hiện trên chủng *Salmonella typhimurium* nhận từ Trung tâm giống vi sinh vật Nhật Bản (Japan Collection of Microorganism, JCM).

Thu mẫu Đom Đóm: Đom Đóm được thu bắt ở khu vực Cầu Giờ TP. Hồ Chí Minh và làm khô bằng P_2O_5 trong chân không. Lồng đèn (cơ quan phát sáng) ở phần đuôi của Đom Đóm khô được tách ra và giữ $-20^\circ C$ cho đến khi dùng.

Hóa chất: luciferase, chất ly trích ATP (FL-SAR), ATP chuẩn của hãng Sigma, Mỹ; luciferin (Biotium, Mỹ); chất ly trích B/S Extractant (Biothema, Mỹ); chất ly trích n-Dodecyl Trimethyl Ammonium Bromide (DTMAB) của hãng Wako, Nhật Bản; bộ kit định lượng ATP (Labsystems, Phần Lan); ammonium sulfate và succinic acid của hãng Prolabo, Pháp; aceton (Trung Quốc); Tris, $MgSO_4$ và dithiothreitol (DTT) của hãng Merck, Đức; bovine serum albumine (BSA) của hãng Boehringer Mannheim, Đức.

Thiết bị đo ánh sáng: tín hiệu phát ra trong phản ứng phát sáng đo bằng thiết bị đo ánh sáng Luminoskan TL (Labsystem, Phần Lan), thể hiện bằng đơn vị ánh sáng tương đối (RLU – Relative Light Unit).

Thực hiện phản ứng phát sáng và đo lượng 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, $MgSO_4$, luciferin và luciferase. Các thành phần ATP, $MgSO_4$, 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, $MgSO_4$, 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 bốn chất ly trích với nồng độ cuối cùng như sau: 10% (v/v) B/S Extractant, 0,1% (w/v) DTMAB, 50% (v/v) FL-SAR và 50% (v/v) ARR. 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. Đậy buồng đo, tiến hành đo và ghi nhận giá trị đo được.

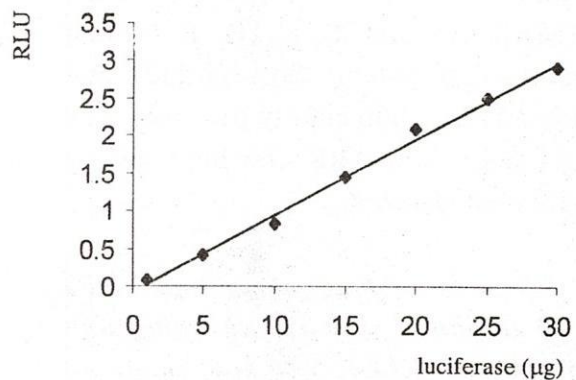
Xác định mật độ tế bào vi khuẩn: mật độ tế bào vi khuẩn *S. typhimurium* (CFU/ml) được xác định bằng phương pháp đổ đĩa trên môi trường thạch dinh dưỡng (0,3% cao thịt, 0,5% pepton, 1,5% agar, pH 6,8).

Tách chiết và tinh chế sơ bộ luciferase từ Đom Đóm [5]: một gram lông đèn khô được nghiền kỹ bằng cối chày sứ trong lạnh trong 3 phút. Bổ sung 30ml acetone lạnh, khuấy đều 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 trên. Dịch trong sau ly tâm được gộp chung lại gọi là dịch chiết thô luciferase. Cân bột AS đã nghiền nhuyễn, bổ sung vào dịch chiết thô luciferase 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 tủa. 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, tủa được huyền phù trở lại với 10% AS. Dung dịch này là dịch luciferase tinh chế không hoàn toàn.

Xác định hoạt tính luciferase; phân tích protein; định lượng tế bào *S. typhimurium* bằng phản ứng phát sáng sử dụng luciferase từ Đom Đóm: được thực hiện như trong báo cáo trước [5-7].

KẾT QUẢ

Hàm lượng của luciferase, luciferin, Mg²⁺ trong phản ứng phát sáng. Luciferase, luciferin và Mg²⁺ 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 1**). Trong các khảo sát tiếp theo lượng luciferase



Hình 1: 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 Mg²⁺)

được chọn là 5µg/phản ứng. Ảnh hưởng của nồng độ Mg²⁺ lên phản ứng phát sáng được khảo sát trong khoảng nồng độ từ 0 – 200mM (Hình 2).

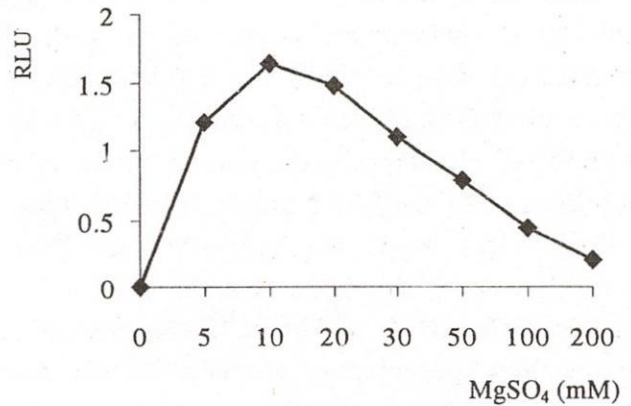
Nồng độ Mg²⁺ tối ưu cho phản ứng là 10mM. Tiếp theo, ảnh hưởng của lượng luciferin đối với phản ứng phát sáng được khảo sát với lượng luciferin thay đổi từ 2 - 64µg/phản ứng với giai số mole ATP được sử dụng từ 10⁻¹⁷ - 10⁻¹³ mole/phản ứng. Kết quả cho thấy ở các trường hợp lượng luciferin dao động trong khoảng 32 - 64µg/phản ứng, có mối tương quan tuyến tính giữa log(RLU) và log(ATP) (Hình 3).

Từ các kết quả thực nghiệm trên có thể xác định thành phần của phản ứng phát sáng là 5µg luciferase/phản ứng, luciferin 32µg/phản ứng trong dung dịch đệm có nồng độ Mg²⁺ là 10mM. Với thành phần phản ứng này có thể xác định ATP trong khoảng từ 10⁻¹⁷ - 10⁻¹³ moles/phản ứng.

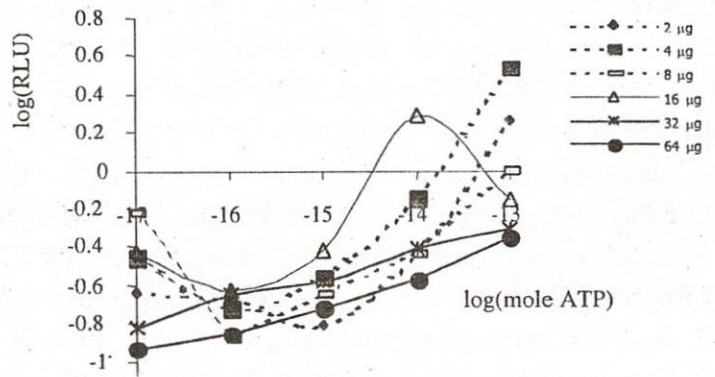
Điều kiện trích ly trích ATP ra khỏi tế bào vi sinh vật.

Tiến hành khảo sát hiệu quả ly trích ATP từ tế bào vi sinh vật của bốn loại chất ly trích: B/S extractant, FL-SAR, n-DTMAB và ARR (ATP Releasing Reagent – Labsystem). So sánh hiệu quả ly trích ATP của bốn chất ly trích trên, các tác giả thấy rằng ARR cho hiệu quả ly trích tốt nhất (Hình 4).

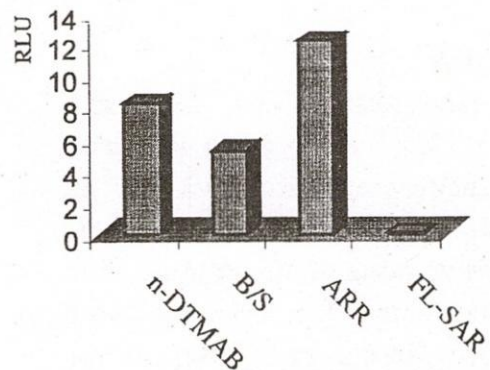
Xây dựng đường tương quan giữa mật độ tế bào vi sinh vật và lượng ánh sáng phát ra (RLU). Với 5µg luciferase cho một phản ứng tín hiệu ánh sáng đo được rất thấp, vì vậy không có sự tuyến tính giữa mật độ tế bào vi sinh vật và lượng ánh sáng phát ra. Ngược lại, khi lượng luciferase đạt 50µg/phản ứng, có sự tương quan tuyến tính giữa lượng ánh sáng phát ra tương ứng với



Hình 2: Ảnh hưởng của lượng tín hiệu ánh sáng đo được (RLU) và nồng độ Mg²⁺ trong một phản ứng (5µg luciferase; 2µg luciferin và 0,04pg ATP)

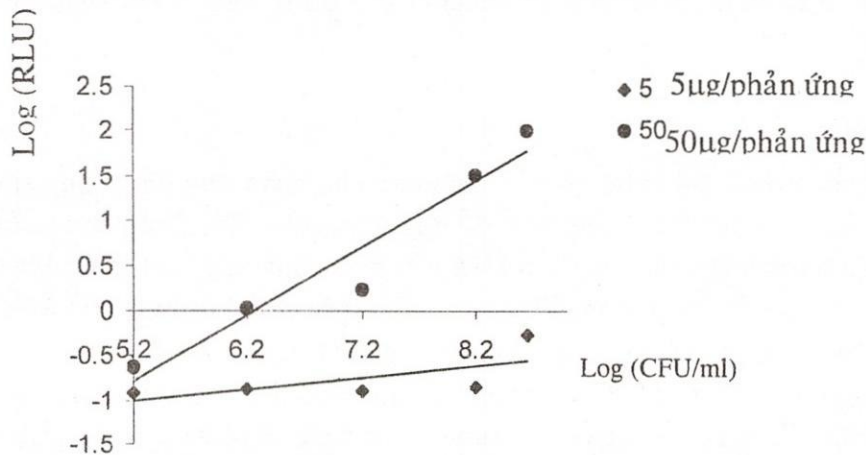


Hình 3: Ảnh hưởng của lượng tín hiệu ánh sáng đo được (RLU) và lượng luciferin khác nhau trong phản ứng



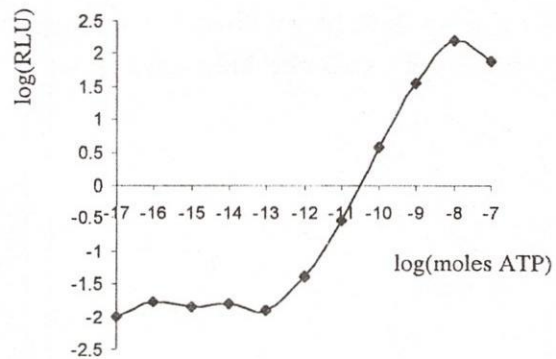
Hình 4: Hiệu quả ly trích ATP ra khỏi tế bào vi sinh vật của các chất ly trích khác nhau

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 5).



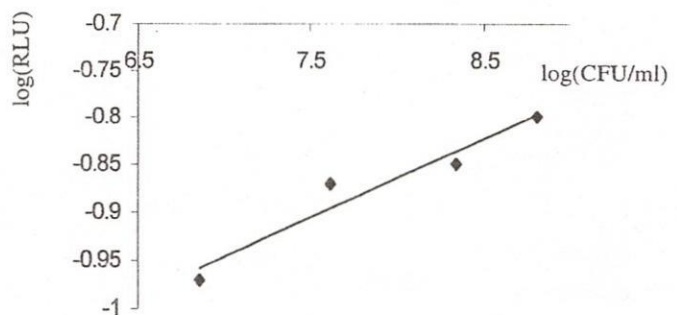
Hình 5: Tương quan tuyến tính giữa mật độ tế bào vi sinh vật và lượng ánh sáng đo được

Định lượng ATP bằng luciferase tách chiết từ Đom Đóm. Do luciferase là thành phần đặc tiền 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 [7]. 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 6 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 6: 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

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 7). Điều này chứng tỏ



Hình 7: Tương quan giữa ánh sáng đo được $\log(\text{RLU})$ và mật độ tế bào vi sinh vật $\log(\text{CFU/ml})$

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.

THẢO LUẬN

Nhằm 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% bảo hòa AS 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.

EXAMINATION ON CONDITIONS OF ATP – DEPENDENT BIOLUMINESCENCE REACTION FOR RAPID QUANTIFICATION OF MICROBES

Vo Minh Trí, Tran Linh Thuoc

Faculty of Biology - University of Natural Sciences - VNU-HCM

ABSTRACT: Essential conditions for the bioluminescence reaction based on ATP – dependent luciferase - luciferin system were examined. Mg^{2+} at the final concentration of 10mM was most suitable. Amount of 5 μ g luciferase and 32 μ g luciferin per reaction was adequate to measure ATP amounts in the range of 10^{-17} – 10^{-13} moles. However, it is only possible to measure the bacterial density of 10^5 – 10^9 CFU/ml with luciferase at 50 μ g and luciferin at 32 μ g per reaction. ARR surface active agent was proved to be the best ATP extracting agent. Using 65% saturated ammonium sulfate fraction of luciferase from firefly lanterns, a linear correlation was established in the range of 10^{-13} - 10^{-8} moles of ATP or 10^7 – 10^9 CFU/ml of bacterial density and the amount of light output. These results supported the using this luciferase preparation for the quantification of ATP or bacterial count in the corresponding ranges of ATP and bacterial cells.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Fung D. Y. C., *Food – borne and Rapid Methods of Detecting Pathogen*, Unesco Southeast Asia Regional Training Workshop, University Bangkok, Thailand (1994)
- [2] Henk Vanstaen, *Laboratory Practice Lumac BV 6372 AD Schaesberg Netherlands*, Vol. 29 No. 12 (1980)
- [3] HACCP, *A Pratical Guide: Campden Food and Drink Research Association*, Technical Manual No. 38, England (1992)
- [4] Stanley P. E. P., *Laboratory Equipment Digest Lumac BV 6372 AD Schaesberg Netherlands* (1982)
- [5] Deluca M., McElroy W. D., *Method. Enzymol.* Academic Press, London (1978)
- [6] Colonick S. P., Kaplan N. O., Ed., *Method. Enzymol.* Vol. 1, Academic Press, London (1955)
- [7] Võ Minh Trí, Trần Linh Thuớc, *Báo cáo Khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc lần I* tr.782 - 9, NXB Khoa học kỹ thuật, Hà Nội (1999)