

TẠO DÒNG SẢN XUẤT LUCIFERASE TÁI TỔ HỢP DÙNG CHO PHẢN ỨNG PHÁT SÁNG SINH HỌC IN VITRO

Võ Minh Trí, Trần Linh Thuớc

Khoa Sinh học - Trường ĐH Khoa học tự nhiên - ĐH Quốc Gia TP.HCM

(Bài nhận ngày 14 tháng 3 năm 2002, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 17 tháng 4 năm 2002)

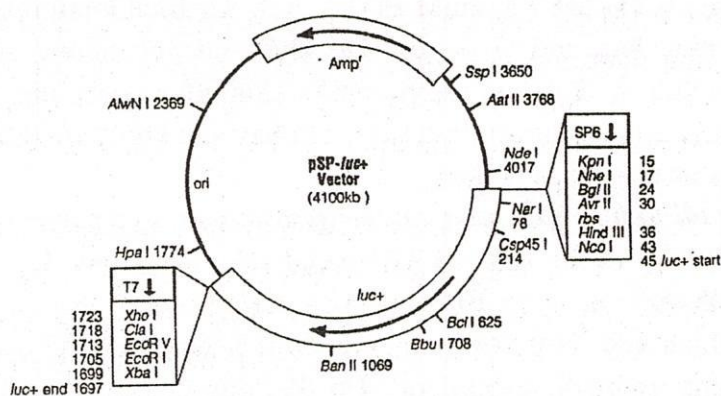
TÓM TẮT: Plasmid pSP-luc+ mang gen mã hoá luciferase từ Đom Đóm được biến nạp vào ba chủng *E. coli* chủ (JM109, DH5 α và BL21(DE3)pLysS) để tạo dòng sản xuất luciferase tái tổ hợp. Trong ba dòng tái tổ hợp nhận được, dòng BL21(DE3)pLysS/pSP-luc+ biểu hiện hoạt tính luciferase cao nhất. Hoạt tính luciferase của dòng này đạt cao nhất sau 24 – 27 giờ nuôi cấy lắc trong môi trường LB. Ảnh hưởng của các dung dịch đệm và các chất ổn định như glycerol và ammonium sulfate lên hoạt tính luciferase được khảo sát.

MỞ ĐẦU

Luciferase từ Đom Đóm (EC 1.13.12.7) là enzyme xúc tác phản ứng ôxi hoá luciferin khi có sự hiện diện của Mg⁺², ATP (adenosine triphosphate) và ôxi phân tử. Phản ứng xảy ra kèm theo sự tạo thành ánh sáng màu xanh vàng có bước sóng 562nm [1,2]. Enzyme này được dùng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như: y học, dược học, sinh lý học, sinh học phân tử, giám sát vệ sinh các dây chuyền sản xuất thực phẩm, lên men công nghiệp, giám sát sự ô nhiễm môi trường... [3-7]. Một ứng dụng quan trọng của phản ứng phát sáng là định lượng nhanh vi sinh vật. Phương pháp này cho kết quả nhanh, độ nhạy cao và chính xác, khắc phục các nhược điểm chậm cho kết quả, sai số cao của các phương pháp định lượng vi sinh vật truyền thống [8]. Tại Việt Nam, do tính cạnh tranh cao của thị trường thế giới, các dạng thực phẩm chế biến, thủy hải sản xuất khẩu được yêu cầu cao về chất lượng và an toàn về mặt vi sinh. Phương pháp định lượng nhanh vi sinh vật bằng phản ứng phát sáng là một công cụ hữu hiệu để giám sát, kiểm tra tình trạng vệ sinh của nguyên liệu, bán thành phẩm, thành phẩm cũng như dây chuyền sản xuất. Trên thực tế một số nhà máy sữa, nông phẩm có vốn đầu tư nước ngoài đã sử dụng phương pháp này trong giám sát chất lượng vệ sinh sản phẩm. Tuy nhiên, việc sử dụng phương pháp này tại Việt Nam chỉ mới giới hạn ở các công ty này vì giá thành rất cao. Việc nghiên cứu chế tạo thiết bị và hoá chất trong nước để thay thế cho ngoại nhập là một trong các biện pháp giảm chi phí, giá thành tạo điều kiện thúc đẩy việc áp dụng rộng rãi hơn của phương pháp này tại Việt Nam. Luciferase là thành phần đắt tiền nhất trong bộ hoá chất. Nếu sản xuất và chủ động được nguồn luciferase chắc chắn sẽ làm giảm giá thành của phương pháp. Luciferase có thể được tách chiết, tinh chế từ Đom Đóm tự nhiên hay Đom Đóm nuôi. Tuy nhiên, giải pháp này khó thực hiện vì số lượng Đom Đóm cần phải lớn, quy trình nuôi chưa được phổ biến và phụ thuộc vào mùa. Một giải pháp khác nhằm chủ động được nguồn luciferase là sản xuất luciferase tái tổ hợp trong *E. coli*. Trong bài báo này, tác giả trình bày một số kết quả trong việc dòng hoá gen mã hoá enzyme luciferase từ Đom Đóm vào vi khuẩn *E. coli* và khảo sát một số điều kiện ảnh hưởng đến sự tổng hợp và hoạt tính của luciferase tái tổ hợp này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Giống vi sinh vật và plasmid: các chủng *E. coli* chủ và plasmid pSP-*luc+* mang gen mã hoá luciferase được cung cấp bởi hãng Promega: *E. coli* JM 109 (*endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *relA1*, *supE44* $\Delta(lac-proAB)$, [F' *traD36*, *proAB lacI^qZAM15*]); *E. coli* DH5 α (F' *endA1 hsdR17* (r_k^-/m_k^-) *sup44 thi* $\lambda^- recA1 gyrA96 \Delta lacU169(\phi 80 lacZAM15)$); *E. coli* BL21(DE3)pLysS (F', *ompT*, *hsdS_B* ($r_B^- m_B^-$), *dcm*, *gal*, (DE3), pLysS, Cm^r). Sơ đồ cấu trúc plasmid pSP-*luc+* như sau:



Hình 1: Sơ đồ cấu trúc plasmid

Hoá chất: CaCl₂, MgCl₂ (Merck – Đức); ampicillin, chloramfenicol (Wako – Nhật); RNase (Sigma); chloroform, isopropanol, ethanol, Tris, MgSO₄, (NH₄)₂SO₄, glycerol, K₂HPO₄, KH₂PO₄, phenol, Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), succinic acid (Prolabo); glacial acetic acid, potassium acetate, NaOH, glucose (Trung Quốc); EcoRI, thang phân tử lượng 1 kb (Biolabs - New England); ATP, agarose (Sigma); luciferin (Biotium – Mỹ).

Biến nạp plasmid mang gen mã hoá luciferase vào tế bào chủ: plasmid pSP-*luc+* được biến nạp vào tế bào chủ theo phương pháp CaCl₂ lạnh như được mô tả trong [9].

Tách chiết và kiểm tra plasmid: plasmid sau khi được biến nạp vào tế bào chủ, được tách chiết theo phương pháp Alkaline – SDS như được mô tả trong [9]. Plasmid sau khi được tách chiết, được cắt với EcoRI, kiểm tra trên gel agarose 1%.

Ly trích luciferase tái tổ hợp ra khỏi tế bào: tế bào được huyền phù trong 2ml dung dịch đệm lạnh Tris – succinic 0,1M pH 7,75, 2mM EDTA trong ống nghiệm. Đặt các ống nghiệm này trong nước đá và tế bào được đồng nhất hóa bằng thiết bị siêu âm (Ultrasonic Cell Disruptor – MICROSON™) ở công suất 9W trong 15 giây. Tiến hành đồng nhất hoá 3 lần, giữa các lần nghỉ 30 giây. Dịch đồng nhất được ly tâm lạnh 20.000g trong 10 phút, lấy dịch trong thử hoạt tính.

Thử hoạt tính luciferase tái tổ hợp: hoạt tính luciferase được xác định trong một dung tích phản ứng 200 μ l gồm: Tris – succinic 0,1M pH 7,75, 10mM MgSO₄, 1mM EDTA, 6,7nmoles luciferin, 4 x 10⁻⁷ moles ATP. Ánh sáng phát ra được đo bằng máy đo ánh sáng Luminoskan (Labsystem – Phần Lan) được thể hiện bằng đơn vị RLU và được dùng để chỉ thị hoạt tính tương đối của luciferase.

Khảo sát sự biểu hiện luciferase tái tổ hợp theo thời gian: dòng *E. coli* tái tổ hợp mang gen mã hoá luciferase được cấy vào môi trường LB có bổ sung kháng sinh (50 μ g/ml ampicillin và 34 μ g/ml chloramfenicol) sao cho OD_{610nm} khoảng 0,05 (Spectrophotometer – Ultrospec 2000 - Pharmacia). Lắc 37°C (*E. coli* JM109), 28°C (*E. coli* BL21(DE3)pLysS). Sau mỗi 3 giờ nuôi cấy, thu mẫu bằng cách hút 2ml dịch nuôi cấy vào eppendorf 2 ml, ly

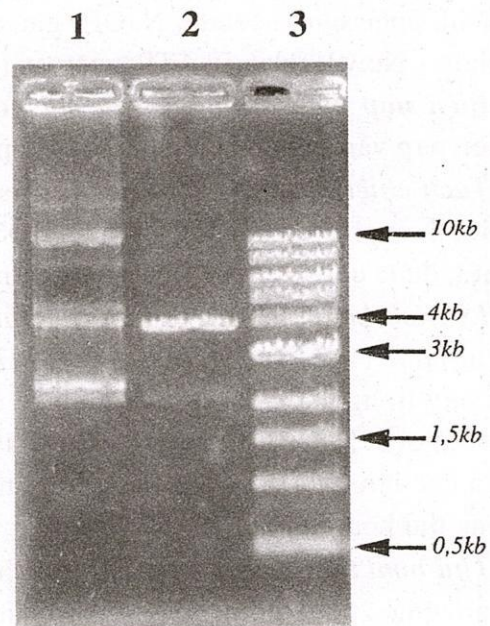
tâm 10.000g, 3 phút ở 4°C. Sinh khối được rửa 2 lần với nước cất và được dùng để ly trích luciferase, đo hoạt tính như được mô tả ở trên.

Khảo sát sự ổn định của luciferase tái tổ hợp: dòng *E. coli* tái tổ hợp mang gen mã hoá luciferase được nuôi cấy lắ ở 37°C trong môi trường LB có bổ sung kháng sinh. Tiến hành thu mẫu cách 3 giờ trong 16 – 18 giờ nuôi cấy, ly tâm thu sinh khối, rửa tế bào, huyền phù trở lại với nước cất và chia thành 2 phần bằng nhau trong eppendorf. Ly tâm thu sinh khối và huyền phù trong 2 điều kiện: (1) Tris – succinic 0,1M pH 7,75, 2mM EDTA lạnh và (2) potassium phosphate 0,1M pH 7,8, 2mM EDTA lạnh. Ly trích luciferase và đo hoạt tính theo từng thời điểm như được mô tả ở trên. Để khảo sát ảnh hưởng của glycerol hoặc ammonium sulfate lên tính ổn định của enzyme, tiến hành thí nghiệm tương tự nhưng có bổ sung thêm glycerol hoặc ammonium sulfate trước khi hay sau khi ly trích luciferase sao cho nồng độ cuối cùng của chất ổn định là 10%.

Sàng lọc dòng tái tổ hợp biểu hiện cao luciferase: biến nạp plasmid pSP-luc+ vào *E. coli* JM109, *E. coli* DH5α và *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Nuôi cấy ba dòng tái tổ hợp (JM109/pSP-luc+, DH5α/pSP-luc+ và BL21(DE3)pLysS/pSP-luc+) trong môi trường LB có bổ sung kháng sinh thích hợp. Đối với dòng JM109/pSP-luc+ và DH5α/pSP-luc+ sử dụng môi trường LB bổ sung ampicilline 50µg/ml. Do đặc tính chủng BL21(DE3)pLysS mang plasmid pLysS có khả năng kháng chloramphenicol (đặc tính này cho phép tế bào chủ mang số lượng bản sao plasmid nhiều hơn các tế bào chủ khác) nên đối với dòng BL21(DE3)pLysS/pSP-luc+) sử dụng môi trường LB bổ sung ampiciline 50µg/ml và chloramphenicol 34 µg/ml. Sau 16 – 18 giờ nuôi cấy, thu sinh khối, rửa tế bào và huyền phù lại trong nước cất. Chính mật độ tế bào của 3 chủng sao cho OD_{610nm} khoảng 1,5. Lấy cùng một thể tích đối với ba chủng, ly tâm, huyền phù trở lại trong dung dịch đệm Tris – succinic 0,1M pH 7,75 2mM EDTA lạnh. Tiến hành ly trích luciferase và đo hoạt tính như trên.

KẾT QUẢ

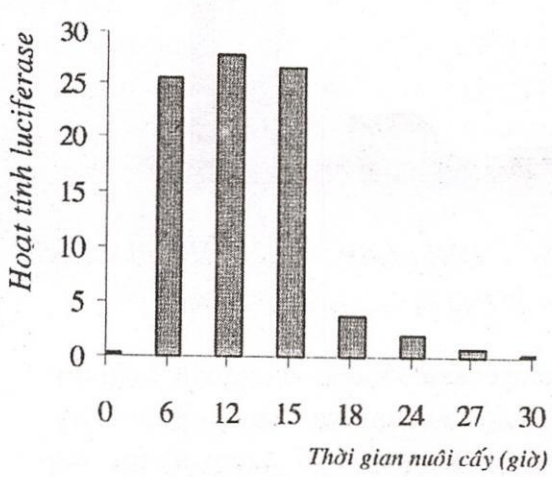
Tách chiết và kiểm tra plasmid. Biến nạp plasmid pSP-luc+ vào tế bào vi khuẩn *E. coli* JM109, trải trên môi trường LB có chứa ampicillin, tác giả đã thu được các thể biến nạp dưới dạng các khuẩn lạc đơn. Một khuẩn lạc đơn được nhân sinh khối. Từ sinh khối DNA plasmid được cắt bằng EcoRI, điện di trên gel agarose 1% với thang chuẩn 1 kb. Kết quả thu được một vạch DNA có kích thước khoảng 4,1 kb tương ứng với kích thước của pSP-luc+ (Hình 2).



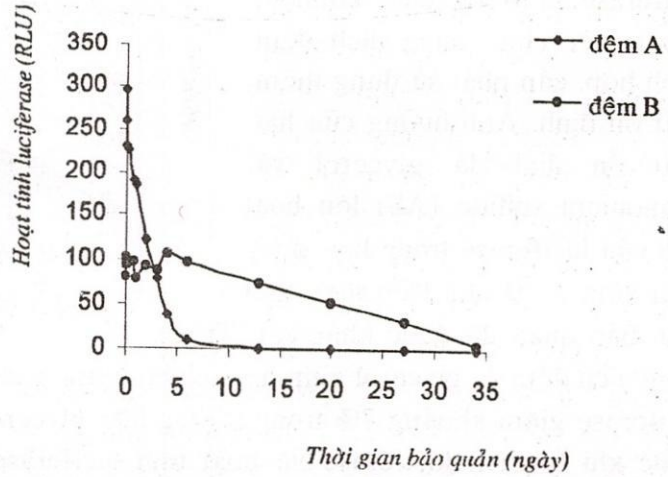
Hình 2: Kiểm tra plasmid từ dòng JM109/pSP-luc+ (giếng 1: pSP-luc+ chưa xử lý với EcoRI; giếng 2: pSP-luc+ đã xử lý với EcoRI; giếng 3: thang 1 kb DNA)

Sự biểu hiện luciferase tái tổ hợp của dòng JM109/pSP-luc+ theo thời gian. Nhằm xác định thời điểm luciferase được biểu hiện nhiều nhất trong tế bào, tác giả đã tiến hành khảo

sát hoạt tính luciferase tái tổ hợp theo thời gian nuôi cấy của dòng JM109/pSP-luc+. Kết quả cho thấy hoạt tính luciferase cao nhất sau 12 – 15 giờ nuôi cấy (Hình 3).

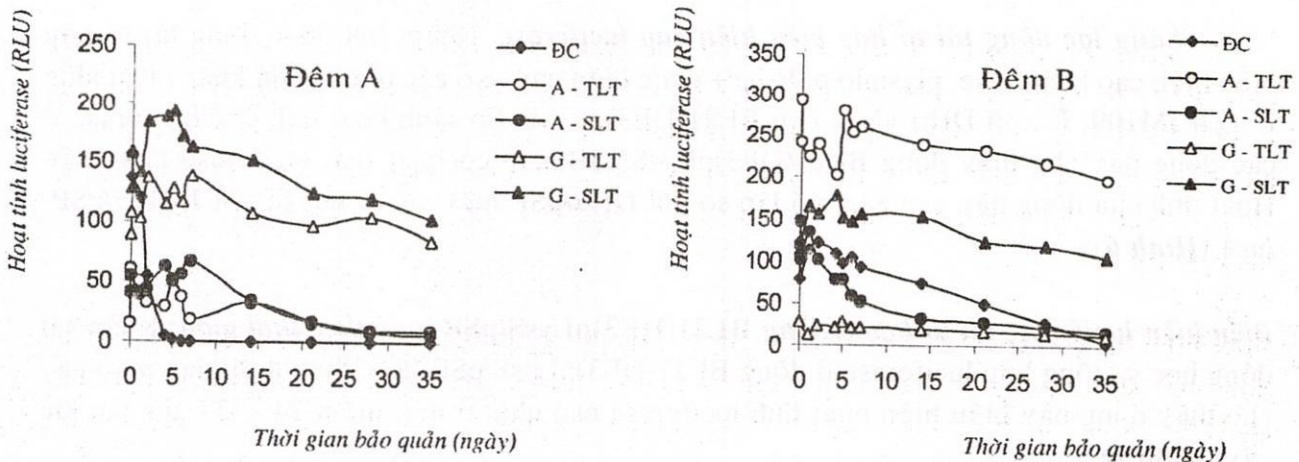


Hình 3: Hoạt tính luciferase theo thời gian sinh trưởng của JM 109/pSP-luc+



Hình 4: Tính ổn định của luciferase tái tổ hợp theo thời gian

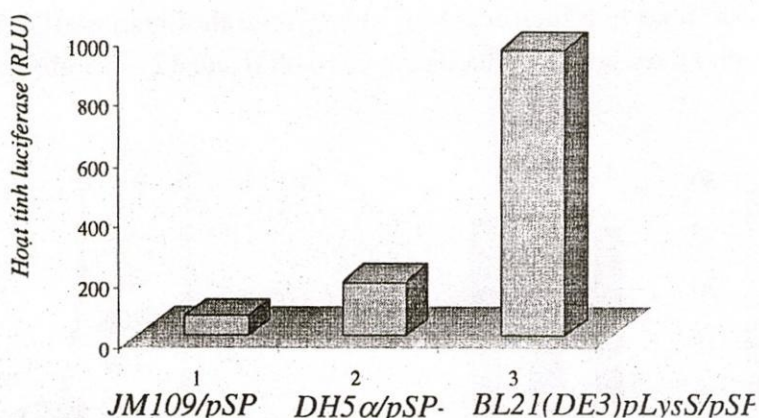
Ảnh hưởng của dung dịch đệm lên hoạt tính luciferase tái tổ hợp. Hai dung dịch đệm thường dùng là Tris – succinic 0,1M pH 7,75, 2mM EDTA (đệm A) và potassium phosphate 0,1M pH 7,8, 2mM EDTA (đệm B) đã được khảo sát về ảnh hưởng của chúng lên hoạt tính luciferase theo thời gian bảo quản. Hoạt tính của luciferase trong đệm A giảm rất nhanh sau vài ngày bảo quản, từ ngày thứ 5 hầu như hoàn toàn mất hoạt tính (Hình 4). Trong đệm B, hoạt tính luciferase ổn định hơn, hầu như ổn định trong 10 ngày bảo quản. Sau đó, hoạt tính giảm dần và bị triệt tiêu sau 35 ngày. Như vậy dung dịch đệm có ảnh hưởng đến tính ổn định của luciferase.



Hình 5: Sự ổn định hoạt tính luciferase tái tổ hợp khi có sự hiện diện của glycerol và ammonium sulfate. DC: không dùng chất ổn định; A - TLT, G - TLT: thêm ammonium sulfate, glycerol trước ly trích luciferase; A - SLT, G - SLT: thêm ammonium sulfate, glycerol sau ly trích luciferase); Đệm A: Tris – succinic 0,1M pH 7,75, 2mM EDTA; Đệm B: potassium phosphate 0,1M pH 7,8, 2mM EDTA.

Ảnh hưởng của chất ổn định lên hoạt tính luciferase tái tổ hợp.

Mặc khác, muốn bảo quản luciferase tái tổ hợp được lâu hơn, ngoài việc chọn dung dịch đệm thích hợp, cần phải sử dụng thêm chất ổn định. Ảnh hưởng của hai chất ổn định là glycerol và ammonium sulfate (AS) lên hoạt tính của luciferase trong hai dung dịch đệm A, B như trên theo thời gian bảo quản đã được khảo sát. Trong

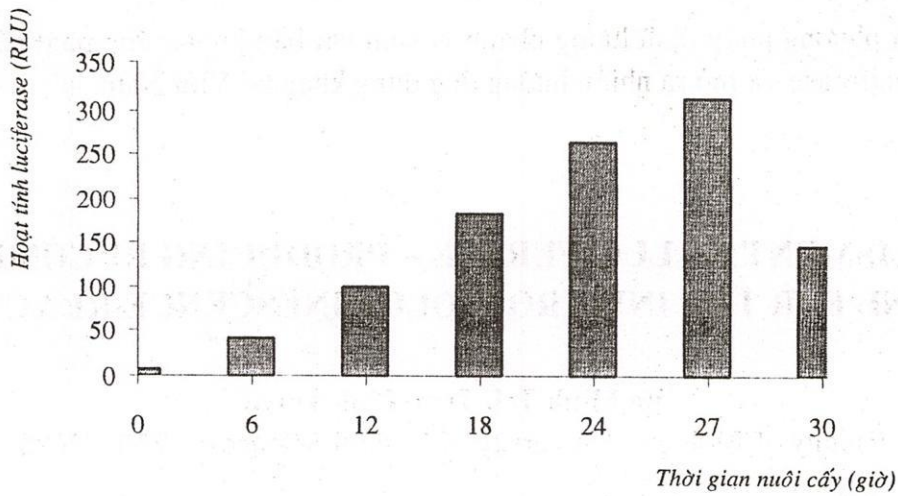


Hình 6: Mức độ biểu hiện luciferase tái tổ hợp

dung dịch đệm A, glycerol giúp ổn định hoạt tính luciferase: sau 35 ngày bảo quản, hoạt tính luciferase giảm khoảng 7% trong trường hợp glycerol được bổ sung vào huyền phù tế bào trước khi ly trích luciferase và hoạt tính luciferase giảm khoảng 20% trong trường hợp glycerol được bổ sung vào huyền phù tế bào ngay sau khi ly trích luciferase (Hình 5). Ngược lại, AS có hiệu quả rất ít trong việc giữ ổn định hoạt tính luciferase: sau 35 ngày bảo quản, hoạt tính luciferase bị mất khoảng 44% trong trường hợp AS được bổ sung vào huyền phù tế bào trước khi ly trích luciferase và giảm khoảng 83% trong trường hợp AS được bổ sung vào huyền phù tế bào sau khi ly trích luciferase. Trong dung dịch đệm B, trường hợp bổ sung glycerol vào huyền phù tế bào ngay sau khi ly trích luciferase ra khỏi tế bào, hoạt tính luciferase bị mất khoảng 14%; trường hợp bổ sung glycerol vào huyền phù tế bào trước khi ly trích luciferase ra khỏi tế bào, 54% hoạt tính luciferase bị mất sau thời gian bảo quản như trên. Đối với chất ổn định AS, nếu được bổ sung vào huyền phù tế bào trước khi ly trích luciferase thì 32% hoạt tính luciferase sẽ bị mất sau 35 ngày bảo quản; nhưng nếu AS được bổ sung vào huyền phù tế bào ngay sau khi ly trích luciferase ra khỏi tế bào, đến 88% hoạt tính luciferase bị mất trong cùng thời gian bảo quản.

Sàng lọc dòng tái tổ hợp biểu hiện cao luciferase. Nhằm thu được dòng tái tổ hợp biểu hiện cao luciferase, plasmid pSP-luc+ được biến nạp vào các tế bào chủ khác nhau như: *E. coli* JM109, *E. coli* DHα và *E. coli* BL21(DE3)pLysS. So sánh hoạt tính của luciferase ở các dòng này cho thấy dòng BL21(DE3)pLysS/pSP-luc+ có hoạt tính luciferase cao nhất. Hoạt tính của dòng này cao gấp 5,5 lần so với DHα/pSP-luc+ và 15 lần so với JM109/pSP-luc+ (Hình 6).

Biểu hiện luciferase tái tổ hợp ở dòng BL21(DE3)pLysS/pSP-luc+ theo thời gian: Khảo sát động học sự tổng hợp luciferase ở dòng BL21(DE3)pLysS/pSP-luc+ theo thời gian nuôi cấy cho thấy dòng này biểu hiện hoạt tính luciferase cao nhất ở thời điểm 24 – 27 giờ sau khi cấy (Hình 7).



Hình 7: Sự biểu hiện luciferase tái tổ hợp ở dòng BL21(DE3)pLysS/pSP-luc+ theo thời gian nuôi cấy

THẢO LUẬN

Nhằm chủ động nguồn enzyme luciferase, tạo điều kiện cho sự ứng dụng rộng rãi phương pháp định lượng nhanh vi sinh vật bằng phản ứng phát sáng sinh học cần ATP tại Việt Nam, các tác giả đã sử dụng tế bào chủ *E. coli* và plasmid pSP-luc+ để thu luciferase tái tổ hợp thay thế cho luciferase thu từ lông đèn Đom Đóm. Thực hiện việc biến nạp pSP-luc+ vào tế bào chủ *E. coli* JM109, các tác giả đã thu được dòng vi khuẩn JM109/pSP-luc+ biểu hiện được luciferase tái tổ hợp. Tiến hành khảo sát động học của sự tổng hợp luciferase tái tổ hợp của dòng này theo thời gian nuôi cấy, các tác giả đã xác định được thời điểm cho hoạt tính luciferase cao nhất là sau 12 – 15 giờ nuôi cấy. Nhằm khảo sát điều kiện bảo quản của luciferase tái tổ hợp, sự ảnh hưởng một số dung dịch đệm và chất ổn định lên hoạt tính của luciferase đã được khảo sát. Kết quả thu được cho thấy việc bổ sung glycerol vào dịch tế bào vi khuẩn chứa luciferase tái tổ hợp được huyền phù hoá bằng dung dịch đệm Tris – succinic 0,1M pH 7,75, 2mM EDTA trước khi ly trích luciferase hay bổ sung glycerol vào dịch tế bào vi khuẩn chứa luciferase tái tổ hợp được huyền phù hoá bằng dung dịch đệm potassium phosphate 0,1M pH 7,8, 2mM EDTA sau khi ly trích luciferase, đã cho phép giữ hoạt tính luciferase ổn định trong thời gian 35 ngày. Như vậy, glycerol có vai trò quan trọng trong việc giữ ổn định hoạt tính luciferase, kết quả này cũng phù hợp với nhiều công bố trên thế giới. Để biểu hiện cao luciferase, ngoài vai trò của promoter, tế bào chủ cũng có vai trò quan trọng. Do vậy tác giả đã tiến hành biến nạp plasmid pSP-luc+ vào ba loại tế bào chủ khác nhau là *E. coli* BL21(DE3)pLysS, *E. coli* DH α và *E. coli* JM109 để tìm dòng tái tổ hợp cho phép biểu hiện luciferase cao nhất. Kết quả thu được cho thấy dòng BL21(DE3)pLysS/pSP-luc+ cho hoạt tính luciferase cao hơn hai dòng tái tổ hợp còn lại. Khảo sát động học của sự tổng hợp luciferase ở dòng này đã cho thấy rằng hoạt tính luciferase cao nhất ở thời điểm sau 24 – 27 giờ nuôi cấy. Mặc dù cần có những nghiên cứu tiếp theo về thiết kế plasmid biểu hiện hữu hiệu để biểu hiện vượt mức luciferase, nhưng những kết quả đạt được trong bài báo này khẳng định có thể sử dụng vi khuẩn để sản xuất luciferase từ Đom Đóm. Kết quả này mở ra khả năng có thể chủ động tạo được nguồn luciferase vì vi khuẩn có ưu điểm là dễ dàng nuôi cấy, tốc độ sinh trưởng nhanh, có thể nuôi với số lượng lớn, ít tốn kém và việc ly trích luciferase khỏi tế bào vi khuẩn khá đơn giản. Các thành công tiếp theo về sự biểu hiện, tinh chế luciferase chắc chắn sẽ giúp làm giảm

giá thành của phương pháp định lượng nhanh vi sinh vật bằng phản ứng phát sáng cần ATP xúc tác bởi luciferase và mở ra nhiều hướng ứng dụng khác tại Việt Nam.

ESTABLISHMENT OF LUCIFERASE – PRODUCING RECOMBINANT CLONE FOR THE INVITRO BIOLUMINESCENCE REACTION

Vo Minh Tri, Tran Linh Thuoc

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

ABSTRACT: The plasmid pSP-luc+, which contains a firefly luciferase gene, is transformed into three E. coli host strains (JM109, DH5 α and BL21(DE3)pLysS) to generate luciferase – producing recombinant clones. Among the three obtained clones, the BL21(DE3)pLysS/pSP-luc+ clone showed the highest luciferase activity. The clone produced highest luciferase activity after 24 – 27 hours of shaking culture in LB medium. Effects of buffers and stabilizing agents such as glycerol and ammonium sulfate on luciferase activity were examined.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Franklin R. Leach, *J. Biolumin Chemilumin.* (11), 149 – 67 (1996)
- [2] Deluca M., McElroy W. D., *Method. Enzymol.* Academic Press, London (1978)
- [3] James A. H. Murray, *Biochem. J.* (319), 343 - 50 (1996)
- [4] Henk Vanstaen, *Laboratory Practice Lumac BV 6372 AD Schaesberg Netherlands*, Vol. 29 No. 12 (1980)
- [5] Stanley P. E. P., *Laboratory Equipment Digest Lumac BV 6372 AD Schaesberg Netherlands* (1982)
- [6] Paul J. Jackson, *Applied and Environmental Microbiology*, 1006 – 12 (1998)
- [7] Marko Virta, *Applied and Environmental Microbiology*, 4456 – 61 (1997)
- [8] Lê Đình Hùng, *Đại cương về phương pháp kiểm tra vi sinh vật thực phẩm*, Trung tâm Kỹ thuật Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng 3 Tp. Hồ Chí Minh (1997)
- [9] Frederick M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J. G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl, *Current Protocols in Molecular Biology Vol 1*, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, USA (1989).