

XÂY DỰNG VÀ PHÁT TRIỂN BIOSENSOR TỪ TẾ BÀO NẤM MEN ỨNG DỤNG TRONG PHÁT HIỆN CÁC HỢP CHẤT GÂY ĐỘT BIẾN GEN

Bùi Văn Ngọc^{1*}, Nguyễn Hữu Đức², Nguyễn Đức Thắng³, Nguyễn Công Hiếu³

¹ Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam;

² Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội;

³ Khoa Công nghệ thực phẩm và hóa học, Trường Đại học Sao Đỏ

Email*: bui@ibt.ac.vn

Ngày gửi bài: 06.05.2013

Ngày chấp nhận: 26.08.2013

TÓM TẮT

Biosensor được phát triển nhờ việc thiết kế và xây dựng một plasmid thông báo mang gen *GFP* được điều khiển bởi promoter *RNR2*. Plasmid thông báo được biến nạp vào tế bào nấm men, sau đó được xử lý với các nồng độ MMS và menadione khác nhau. Thông qua cơ chế cảm ứng hoạt động bởi hợp chất gây biến đổi gen MMS, mà promoter *RNR2* điều khiển sự phiên mã và biểu hiện của *GFP*, dẫn đến tín hiệu huỳnh quang phát ra khi đo tại 485nm (sóng kích thích) và 535nm (sóng phát xạ). Cường độ huỳnh quang đo được tỷ lệ thuận với nồng độ MMS có trong môi trường phân tích và đạt cực đại tại 1mM, nhưng giảm dần khi xử lý với nồng độ MMS trên 1mM, hiệu ứng này là do hoạt động hô hấp tế bào và quá trình sinh tổng hợp ATP bị kim hãm. Ngược lại, menadione không gây kích thích promoter *RNR2* hoạt động, nên không có tín hiệu huỳnh quang được ghi nhận. Chính vì vậy, biosensor theo thiết kế này không những có tiềm năng trong việc xác định, phát hiện các hợp chất gây biến đổi gen, độc hại tới con người và môi trường, mà còn phát hiện các hợp chất mới có cùng tính chất hóa học với MMS và có thể ứng dụng trong phát hiện thuốc mới và sàng lọc dược phẩm.

Từ khóa: Biosensor, độc tính gen, độc tính tế bào, gen thông báo (reporter gene), *GFP* (green fluorescent protein), methyl methanesulfonate, menadione.

Construction and Development of Yeast-based Biosensor Applied for Detection of Genotoxic Chemical Compounds

ABSTRACT

Biosensor was developed by design and construction of a reporter plasmid containing *GFP* gen under regulation of *RNR2* promoter. This reporter plasmid was transformed in yeast cells which were then treated with different concentrations of MMS and menadione. Due to induction of genotoxic compounds, such as MMS, *RNR2* promoter regulates transcription and translation of *GFP* leading to fluorescence signal measured at 485nm (excitation wave length) and 535nm (emission wave length). Fluorescence intensity was directly proportional to MMS concentrations when yeast cells treated with less than 1mM in the environment, but decreasing when exposed to higher MMS concentrations as a result of inhibition of cellular respiration and ATP synthesis. In contrast, promoter *RNR2* was not induced by menadione resulting in no fluorescence signal. Thus, this kind of biosensor is able to not only determine and detect genotoxic chemical compounds, which are harmful to human and environment, but also identify new and uncharacterized compounds which possess the same chemical properties as MMS, and could be used in new drug discovery and drug screening.

Keywords: Biosensor, cytotoxicity, genotoxicity, *GFP*, methyl methanesulfonate, menadione, reporter gene.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, cùng với sự phát triển nhanh chóng của dân số thì nhu cầu

về thực phẩm ngày càng tăng. Tuy nhiên, cùng với sự phát triển và nhu cầu gia tăng đó thì vấn đề an toàn thực phẩm và kiểm soát môi trường lại rất cần được quan tâm. Bên cạnh đó, việc

đánh giá và kiểm soát các chất thải từ các nhà máy chế biến thực phẩm, nước thải của các nhà máy tại khu công nghiệp chưa được quan tâm đúng mức dẫn đến môi trường bị ô nhiễm nghiêm trọng. Một trong các hợp chất độc hại đó phải kể đến các hợp chất có khả năng gây biến đổi gen, gây ung thư, ví dụ như các hợp chất hydrocarbon thơm đa vòng trong nước thải tại các khu công nghiệp (Rodriguez-Mozaz et al., 2005), aflatoxin B1 có trong một số ngũ cốc bị mốc và sữa (Dinc̣kaya et al., 2011; Paniel et al., 2010; Sapsford et al., 2006), sterigmatocystin có trong thực phẩm, sản phẩm sữa hư hỏng (Yao et al., 2006)...

Cho đến nay, việc phát hiện các hợp chất này được xác định bằng các phương pháp hóa lý như sắc ký lỏng cao áp (HPLC), sắc ký khí khối phổ (GC-MS) (McCoy et al., 2008; Rodriguez Velasco et al., 2003; Scudamore et al., 1996) hoặc các phương pháp hóa sinh như các dạng test ELISA (Gundinc̣ et al., 2009; Kolosova et al., 2006; Lee et al., 2004; Lupo et al., 2010)... Các phương pháp này có ưu điểm là định tính hoặc định lượng chính xác một hợp chất nào đó, nhưng không đánh giá được ảnh hưởng về mặt sinh học của hợp chất đó, như độc tính tế bào (cytotoxicity), độc tính gen (genotoxicity). Chính vì thế, từ lâu người ta đã nghiên cứu và phát triển một công cụ phân tích với tên gọi cảm biến sinh học (biosensor) không chỉ phát hiện, mà còn đánh giá ảnh hưởng về mặt sinh học của một hợp chất nào đó.

Vì vậy, ở Việt Nam cũng như trên thế giới, ngày càng có nhiều loại biosensor được chế tạo từ enzym, protein, plasmid... Một trong các công trình đó là phương pháp tạo kit Acetylcholinesterase (AChE) – Bioassay từ enzym để phát hiện dư lượng thuốc bảo vệ thực vật (Đỗ Biên Cương et al., 2009). Một số biosensor phát triển từ protein, plasmid để phát hiện và xác định một số hợp chất hóa học, các độc tố (Lumjiaktase et al., 2010; Pazos et al., 2009; Wang et al., 2009), và để xác định trạng thái năng lượng tế bào (Berg et al., 2009) hoặc định lượng một số kim loại (Isarankura-Na-Ayudhya et al., 2010)... Bên cạnh đó, còn nhiều biosensor cấu tạo bởi tế bào vi khuẩn, nấm men

để phát hiện và xác định sự có mặt một số hợp chất gây độc, gây tổn thương DNA (Benton et al., 2007; Garcia-Alonso et al., 2010; Lavrinenko et al., 2006; Martineau et al., 2009), gây độc tế bào (Wada et al., 2008), nhận dạng stress ôxi hóa (do các gốc ôxy hóa tái hoạt động nội bào gây ra) (Jayaraman et al., 2005; Mitchell et al., 2004), phát hiện đột biến gen (Tak et al., 2008), phát hiện một số kim loại nặng như catmi (Cd), asen (As) và các muối của nó trong kiểm soát môi trường (Gu et al., 2004; Stocker et al., 2003; Wu et al., 2009).

Tuy nhiên, cũng như phương pháp HPLC và GC-MS, biosensor phát triển từ DNA, enzym, protein... phù hợp cho việc phát hiện một tác nhân nào đó thông qua cơ chế phản ứng, bắt cặp đặc hiệu..., nhưng lại không đánh giá được khả năng gây độc gen hoặc tế bào của hợp chất cần phân tích. Chính vì thế, tế bào nguyên vẹn của vi khuẩn, đặc biệt là của nấm men thường được sử dụng để phát triển biosensor (Gu et al., 2004; Taniguchi, 2010; Wada et al., 2008). Bởi lẽ, tổng số gen tương đồng giữa người và nấm men là hơn 40%, các con đường sinh hóa giữa người và nấm men được bảo tồn cao, tế bào nấm men có ty thể, có nhân thật, nơi mà DNA nhiễm sắc thể được gói cuộn trong một cấu trúc bậc cao tương đồng với cấu trúc tìm thấy ở động vật có vú (Petranovic et al., 2010). Trong khi đó những đặc điểm quan trọng này không tìm thấy ở vi khuẩn. Vì vậy, trong nghiên cứu này, tế bào nấm men cùng với các thành phần cảm thụ sinh học thích hợp được sử dụng để xây dựng, phát triển biosensor và thử nghiệm phân tích các hợp chất menadione và methyl methane sulfonate (MMS) với mục đích ứng dụng trong sàng lọc và phát hiện các hợp chất có cùng tính chất hóa học tương tự sau này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu và hóa chất

Chủng vi khuẩn *E. Coli* DH5 α nấm men *Saccharomyces cerevisiae* kiểu dại, được ký hiệu là Y486wt (*MATa leu2-3,112 ura3-52, lys2-1, his7-1*) cùng với gen thông báo *GFP* (Green Fluorescent Protein) mã hóa cho protein cùng

tên, promoter *RNR2* và plasmid pUMGP5 sử dụng trong nghiên cứu này được cung cấp bởi Stefan Wölfl, Viện Dược và Công nghệ sinh học phân tử - Đại học Heidelberg (CHLB Đức).

Thành phần môi trường Yeast Peptone Dextrose, trong 1 lít dung dịch (YPD): 10g dịch chiết nấm men; 20g bacto peptone; 20g glucose; có hoặc không bổ sung G418 (Geneticin, 100 mg/l) và 2% Agar. Môi trường F1 trong 1 lít dung dịch gồm 2g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3g KH_2PO_4 ; 0,55g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,06g CaCl_2 ; 0,1g NaCl ; 1mg H_3BO_3 ; 1mg $\text{CaSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 1mg KI ; 5mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 7mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 20mg leucine; 20mg histidine; 30mg lysine; 62 μg inositol; 14 μg thiamine HCl; 4 μg pyridoxine; 4 μg pantothenate; 0,3 μg biotin; 20g glucose (Walmsley et al., 1983).

Menadione, MMS cùng các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu này được mua từ hãng Sigma-Aldrich và New England BioLabs.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế và xây dựng plasmid thông báo

Promoter (1568bp) của gen *RNR2* ở *Saccharomyces cerevisiae* được cắt bằng hai enzym giới hạn *Bam*HI và *Pac*I (20 μl *RNR2* từ sản phẩm PCR đã tinh sạch gen; 3 μl 10xNEBuffer 1; 3 μl 10xBSA; 1,5 μl *Bam*HI; 1,5 μl *Pac*I; 2,5 μl H_2O ; ủ tại 37°C/ qua đêm; bất hoạt tại 65°C/ 20 phút). Promoter *RNR2* được chèn vào trước gen báo cáo *GFP* ở tại hai vị trí cắt giới hạn *Bam*HI và *Pac*I trên plasmid *RNR2*-pUMGP5 (1 μl plasmid; 3 μl promoter; 0,75 μl 10xT₄-DNA Ligase Buffer; 0,5 μl T₄-DNA Ligase; 0,5 μl H_2O ; ủ tại 16°C/ qua đêm). Promoter *RNR2* sẽ điều khiển quá trình phiên mã của gen thông báo *GFP*, qua đó tạo thành plasimid *RNR2-GFP*-pUMGP5 và gọi là plasmid thông báo (Hình 1).

2.2.2. Biến nạp plasmid thông báo vào tế bào nấm men

Tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* sau khi ly tâm tại 3500 rpm từ canh trường nuôi cấy được rửa lại trong 500 μl LioAc 100mM, ủ tại 30°C/ 30min/ 800rpm. Lấy 50 μl dịch tế bào cho

vào ống nghiệm đã có sẵn 5 μl Herring Sperm DNA và 3 μl plasmid, ủ tiếp tại 30°C/ 20 min. Bổ sung 300 μl dung dịch PEG 40% đã hòa tan trong 100mM LioAc, ủ tại 30°C/ 20 min. Tiếp tục bổ sung 35,5 μl DMSO, rồi tiến hành sốc nhiệt tại 42°C/ 15 min. Ly tâm 7000rpm/3 min thu cặn, cặn được hòa tan trong 1ml môi trường YPD, ủ tại 30°C/ 3h/ 850rpm. Ly tâm 3500 vòng/ 5 min thu cặn tế bào, cặn được hòa tan trong phần dịch còn lại và được trải đều lên môi trường YPD thạch chứa kháng sinh G418, ủ trong tủ ấm 30°C/ qua đêm.

2.2.3. Đánh giá độc tính gen bằng phương pháp đo cường độ huỳnh quang phát xạ

Tế bào nấm men từ đĩa thạch được nuôi trong 3ml môi trường YPD có bổ sung G418, ủ 30°C/ 250rpm qua đêm. Dịch nuôi cấy được chuyển vào 3ml môi trường F1 có bổ sung G418 với OD₆₀₀ khởi đầu là 0,2 và được dùng trực tiếp cho thí nghiệm đánh giá độc tính gen. Thí nghiệm được thực hiện trên đĩa nhựa 96 giếng, thành giếng màu đen có đáy trong suốt (96-well microplate, Greiner-Bio One). Mỗi giếng trên đĩa chứa 150 μl tổng số bao gồm 75 μl dịch nuôi cấy trong môi trường F1 có bổ sung G418 và 75 μl dung dịch menadione (0; 6,25; 12,5; 25 và 50 μM) hoặc MMS (0; 0,5; 1; 2 và 4mM). Mỗi phép đo được lặp lại 3 lần để lấy giá trị trung bình và tính độ lệch chuẩn. Đĩa được ủ trong tủ ấm 30°C/ 150rpm. Sau 16h và 24h, đo tín hiệu huỳnh quang của tất cả các giếng có xử lý và không xử lý hóa chất (đối chứng) tại 485nm (bước sóng kích thích) và 535nm (bước sóng phát xạ), đồng thời đo độ hấp thụ tế bào tại 600nm hay OD₆₀₀ (Tecan Ultra Microplate Reader, Tecan). Quá trình đo đặc và ghi lại số liệu đều thông qua phần mềm Excel-Makro XFLUOR4 Version 4.51 (Tecan).

2.2.4. Tính toán, xử lý và biểu diễn kết quả

Trước tiên, tín hiệu huỳnh quang của giếng xử lý (GFP_{xl}) hoặc đối chứng (GFP_{dc}) được chia tương ứng cho mật độ tế bào của giếng xử lý ($\text{OD}_{600\text{ xl}}$) hoặc đối chứng (OD_{dc}) thu được tín hiệu huỳnh quang riêng (GFP riêng). Tiếp theo, chia GFP riêng của giếng xử lý cho GFP riêng của

giếng đối chứng được số lần cảm ứng (GFP fold induction) của giếng xử lý so với đối chứng, kết quả của tỷ số này dùng để so sánh và đánh giá tín hiệu huỳnh quang phát ra tại mỗi giếng xử lý so với đối chứng. Việc tính toán có thể tóm tắt dưới dạng công thức như sau:

$$\text{GFP}_{\text{xl (dc)}} / \text{OD}_{600 \text{ xl (dc)}} = \text{GFP riêng}$$

$$\text{GFP riêng}_{\text{xl}} / \text{GFP riêng}_{\text{dc}} = (\text{lần cảm ứng, GFP fold induction})$$

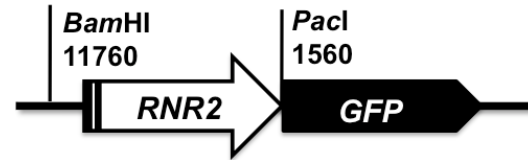
Kết quả sau khi tính toán và xử lý sẽ được biểu diễn trên đồ thị hình cột bằng MS-Excel.

3. KẾT QUẢ

3.1. Thiết kế và xây dựng plasmid thông báo

Ở nấm men, sự phiên mã của một số gen có chức năng bảo vệ tế bào như *RNR2*, *RAD54*, *ARP2*, *DIN7*, *POL30*... bị kích thích hoạt động khi có mặt của một số hợp chất hóa học gây đột biến gen (Cahill et al., 2004; Walsh et al., 2002). Lợi dụng tính chất này mà promoter của những gen kể trên được sử dụng làm yếu tố nhận biết và được chèn trước gen thông báo làm yếu tố chuyển đổi tín hiệu. Có bảy loại gen thông báo mã hóa cho protein cùng tên. Tuy nhiên, gen mã hóa cho GFP (green fluorescent protein) được dùng phổ biến nhất, do GFP có khả năng tự phát huỳnh quang (auto-fluorescence), không cần bổ sung cofactor hoặc cơ chất để phát sáng, rất bền trong môi trường pH nội bào và thao tác thí nghiệm nhanh, đơn giản (Daunert et al., 2000). Trong nghiên cứu này, đoạn promoter (1568 bp) của gen *RNR2* được xử lý bằng *Bam*HI và *Pac*I, và chèn vào trước gen thông báo GFP

tại vị trí cắt của hai enzym này trên plasmid GFP-pUMGP5 để tạo thành plasmid thông báo *RNR2*-GFP-pUMGP5 (Hình 1).

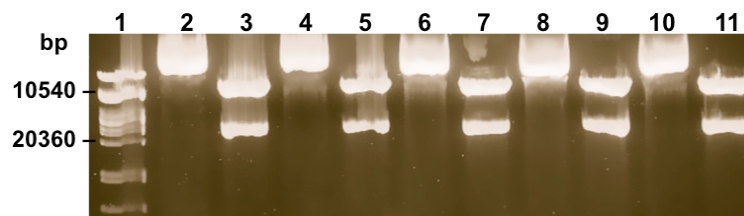


Hình 1. Giải đồ vị trí của promoter *RNR2* điều khiển hoạt động của gen GFP trên plasmid GFP-pUMGP5

Theo cách bố trí như Hình 1, khi có mặt một hợp chất gây đột biến gen, promoter *RNR2* sẽ bị kích thích hoạt động và điều khiển sự phiên mã của gen thông báo GFP dẫn đến quá trình biểu hiện protein thông báo GFP. Cường độ hoặc tín hiệu của protein thông báo đo được sẽ tương ứng với nồng độ chất gây cảm ứng có trong môi trường cần phân tích (Afanassiev et al., 2000; Daunert et al., 2000).

3.2. Biến nạp plasmid thông báo vào nấm men

Trước khi biến nạp vào tế bào nấm men, plasmid thông báo *RNR2*-GFP pUMGP5 được tạo dòng bằng cách biến nạp vào tế bào *E. Coli* DH5α (Bergmans et al., 1981; Froger and Hall, 2007). Sau đó, plasmid được tách và tinh sạch (Plasmid Midi and Maxi Kits, QIAGEN). Sự có mặt của *RNR2* được xác định bằng phản ứng cắt bởi *Bam*HI và *Pac*I, cuối cùng được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% (Hình 2).



Hình 2. Kiểm tra đoạn chèn *RNR2* trên plasmid bằng điện di trên gel agarose 1%

Giếng 1: thang DNA chuẩn; giếng 2, 4, 6, 8, 10: plasmid tách từ 5 khuẩn lạc khác nhau;

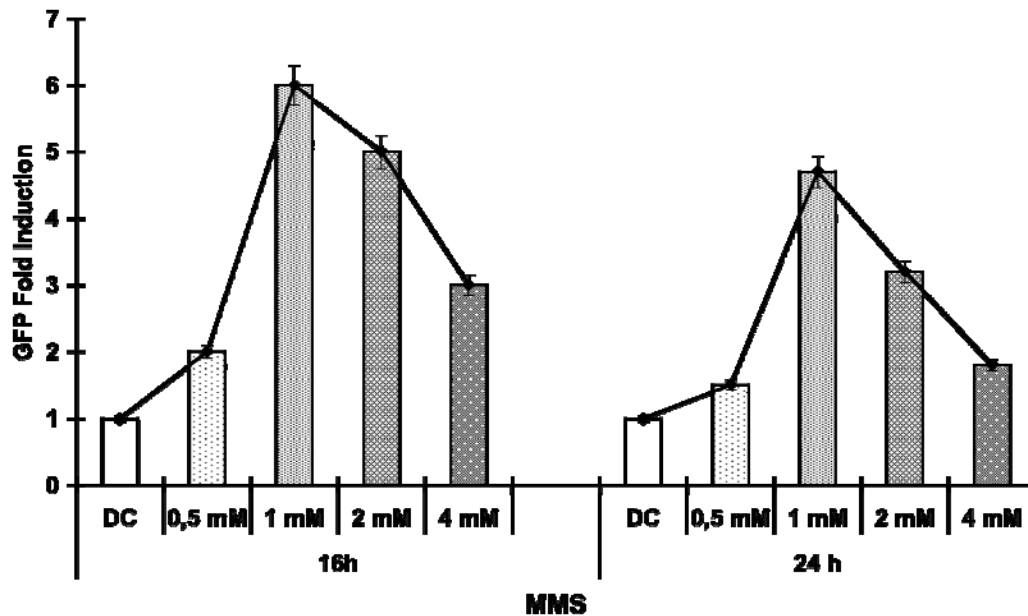
giếng 3, 5, 7, 9, 11: plasmid và *RNR2* sau khi cắt bằng hai enzym *Bam*HI và *Pac*I

Kết quả điện di trên gel agarose cho thấy, promoter RNR2 đã được chèn vào plasmid GFP-pUMGP5 tạo thành plasmid RNR2-GFP-pUMGP5 có kích thước 11917bp (Hình 2; giếng 2, 4, 6, 8 và 10) và chèn vào đúng vị trí cắt của BamHI và PacI khi tạo thành hai băng vạch trên gel điện di là plasmid GFP-pUMGP5 có kích thước 10349 và đoạn RNR2 có kích thước 1568 bp (Hình 2; giếng 3, 5, 7, 9 và 11). Kết quả này cũng tương đương với công bố trước đây (Afanassiev et al., 2000). Plasmid RNR2-GFP-pUMGP5 sau đó được biến nạp vào tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (Y486wt), chọn lọc trên môi trường YPD có G418 để tạo thành biosensor dạng tế bào mang plasmid thông báo.

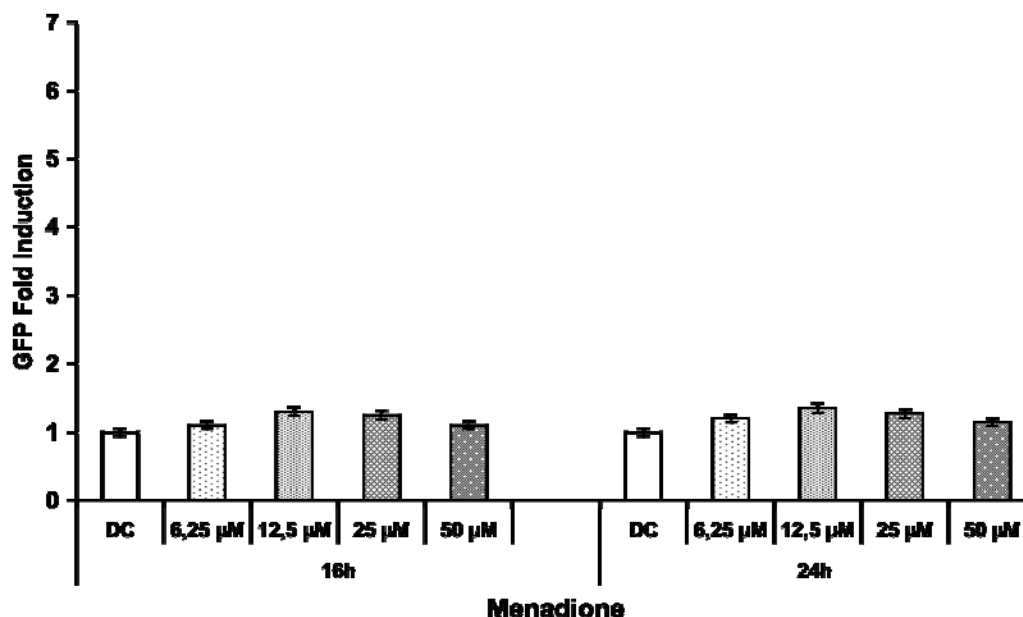
3.3. Sử dụng biosensor xác định và đánh giá hợp chất gây biến đổi gen

MMS là tác nhân alkyl hóa bằng cách gắn nhóm methyl lên vị trí N⁷-deoxyguanine và N³-deoxyadenine của phân tử DNA, đồng thời là tác nhân ngăn chặn các tái bản (Lundin et al.,

2005), dẫn đến đột biến gen và gây ung thư. Vì thế, MMS thường được dùng như một chất chuẩn trong nghiên cứu đột biến gen và là chất đối chứng trong việc xác định hợp chất mới có khả năng gây đột biến gen hoặc gây ung thư tiềm tàng (Huang et al., 2013; Piening et al., 2013). Tế bào nấm men mang plasmid RNR2-GFP-pUMGP5 được nuôi trong môi trường chọn lọc F1 có xử lý với nồng độ MMS khác nhau. Mối tương quan giữa nồng độ MMS gây cảm ứng và tín hiệu huỳnh quang phát ra khi đo tại 485nm (sóng kích thích) và 535nm (sóng phát xạ) sau 16 và 24h nuôi ủ được ghi lại và biểu diễn ở Hình 3. Kết quả cho thấy, sự có mặt của MMS đã kích thích promoter RNR2 hoạt động dẫn đến quá trình phiên mã, biểu hiện và phát hiện huỳnh quang của GFP. Ở thời điểm sau 16h nuôi ủ, khi nồng độ MMS tăng, cường độ GFP có xu hướng tăng theo và tăng cao nhất tại nồng độ 1mM, gấp khoảng 6 lần so với cường độ GFP của mẫu đối chứng. Hiệu ứng này có xu hướng giảm dần khi nồng độ MMS vượt ngưỡng 1mM (2mM - 4mM, Hình 3).



Hình 3. Mối tương quan giữa nồng độ MMS gây cảm ứng và tín hiệu huỳnh quang phát ra (DC: đối chứng; GFP Fold Induction: cường độ GFP cảm ứng (lần) của mẫu xử lý với MMS so với mẫu đối chứng)



Hình 4. Mỗi tương quan giữa nồng độ Menadione gây cảm ứng và tín hiệu huỳnh quang phát ra (DC: đối chứng; GFP Fold Induction: cường độ GFP cảm ứng (lần) của mẫu xử lý với Menadione so với mẫu đối chứng)

Giống như ở thời điểm 16h, hiệu ứng này cũng được quan sát tương tự sau 24h nuôi ủ (Hình 3). Tuy nhiên, cường độ GFP phát ra hay mức độ biểu hiện của GFP sau 24h nhỏ hơn so với thời điểm sau 16h. Hiện tượng này là do khi nồng độ MMS tăng ($> 1\text{mM}$), mức độ gây đột biến gen càng mạnh, đặc biệt là gen ty thể, làm ức chế hoạt động của ty thể và chuỗi vận chuyển điện tử, dẫn đến quá trình sinh tổng hợp ATP giảm mạnh và không cung cấp đủ năng lượng cho các hoạt động sống của tế bào (Kitanovic et al., 2009). Thêm vào đó, trong môi trường tối thiếu (SD, F1...) tại 16h là thời điểm tế bào đã qua pha logarit, sự biểu hiện protein và mật độ tế bào tăng sinh cực đại, đầy đủ. Qua thời điểm này tế bào đi vào pha tĩnh và già hóa khiến mật độ tế bào giảm dần (Kitanovic et al., 2009; Kitanovic et al., 2006).

Trái ngược với kết quả xử lý với MMS, khi xử lý với menadione không gây cảm ứng biểu hiện và phát huỳnh quang của GFP ở các nồng độ (Hình 4).

Menadione là một hợp chất hóa học tổng hợp, thường được sử dụng làm thành phần dinh dưỡng bổ sung do tính chất gần giống vitamin K, nên được gọi là tiền vitamin K. Tuy vậy, menadione thường được khuyến cáo không sử dụng cho người, mà chủ yếu dùng cho gia súc với nồng độ thấp. Bởi lẽ, việc sử dụng menadione liều cao gây thiếu máu, tổn thương não... (theo Cục quản lý dược phẩm và thực phẩm Mỹ, FDA). Bên cạnh đó, độc tính tế bào (cytotoxicity) được quan sát ở *saccharomyces cerevisiae* khi xử lý với $0,5\text{mM}$ menadione (Castro et al., 2008). Chính vì thế, menadione là hợp chất không gây đột biến gen, do đó không gây kích thích promoter RNR2 hoạt động và không gây độc tế bào ở các nồng độ khảo sát, mà đóng vai trò như một thành phần dinh dưỡng (Hình 4).

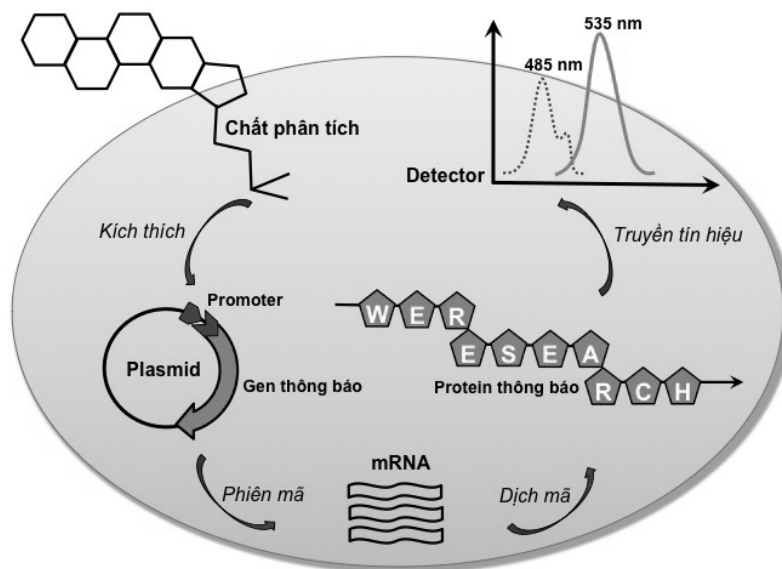
4. THẢO LUẬN

Việc phát hiện, sàng lọc và đánh giá các hợp chất độc hại mang ý nghĩa thời sự trong công tác

kiểm soát chất lượng an toàn thực phẩm, kiểm soát và xử lý môi trường, cũng như trong lĩnh vực y tế, bảo vệ sức khỏe cộng đồng. Nhờ khả năng bị kích thích hay cảm ứng hoạt động bởi một hoặc vài chất mà promoter của một số gen được sử dụng làm yếu tố nhận biết chọn lọc trong việc phát triển biosensor. Trong nghiên cứu này promoter RNR2 được dùng trong xác định và đánh giá các hợp chất gây đột biến gen thuộc nhóm alkyl hóa DNA là MMS và menadione là hợp chất tiền vitamin K. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, tín hiệu huỳnh quang của GFP tuyến tính với nồng độ MMS gây cảm ứng và đạt cực đại tại 1mM như một số công bố trước đó (Afanassiev et al., 2000; Cahill et al., 2004). Ngoài ra, còn cho thấy khi nồng độ MMS > 1mM, tín hiệu huỳnh quang có xu hướng giảm. Kết quả này có thể giải thích là do ở nồng độ cao MMS gây ức chế hoạt động hô hấp của tế bào, dẫn đến quá trình sinh tổng hợp năng lượng ATP cho hoạt động tế bào bị kìm hãm (Kitanovic et al., 2009; Kitanovic et al., 2006). Trong khi đó, tín hiệu huỳnh quang GFP hầu như không thay đổi ở tất cả nồng độ menadione xử lý, do menadione không phải là hợp chất gây

đột biến như MMS, mà chỉ gây độc tế bào khi xử lý với nồng độ 0,5mM, gấp 10 lần so với trong nghiên cứu này (Castro et al., 2008). Nghiên cứu khác cũng chỉ ra rằng, menadione ở nồng độ cao sẽ gây độc tế bào hoặc stress ôxi hóa (oxidative stress) (Bladen et al., 2012; Chaves et al., 2012).

Mặc dù nghiên cứu này chỉ thử nghiệm với hai hợp chất: gây biến đổi gen MMS và hợp chất tổng hợp menadione. Tuy nhiên, bên cạnh MMS, biosensor kiểu này còn được sử dụng để phát hiện, phân tích các hợp chất khác thuộc nhóm alkyl hóa DNA như mitomycin C, N-nitroso-N-methylurea, chlorambucil (Afanassiev et al., 2000; Billinton et al., 1998; Cahill et al., 2004). Hơn thế nữa, từ kết quả này người ta có thể phát triển nhiều loại biosensor khác nhau, tùy vào mục đích sử dụng và yêu cầu phát hiện, thông qua việc thiết kế và xây dựng promoter, gen thông báo, hệ thống biểu hiện thích hợp trong việc nhận biết hợp chất đó. Ví dụ, sử dụng promoter ARS của gen arsR để nhận biết Asen, promoter PBR của gen pbrR nhận biết chì, promoter MER của gen merR nhận biết thủy ngân... (Daunert et al., 2000; Vastarella et al., 2005).



Hình 5. Cơ chế hoạt động của biosensor trong việc xác định và phát hiện hợp chất hóa học cần phân tích (Bui, 2006)

Cơ chế hoạt động của biosensor theo thiết kế này trong việc xác định, phát hiện hợp chất hóa học đặc hiệu nói chung và MMS nói riêng có thể được mô tả như hình 5. Mỗi loại promoter đóng vai trò như yếu tố nhận biết đặc hiệu và bị kích thích hoạt động bởi hợp chất nào đó. Tiếp theo, promoter điều khiển quá trình phiên mã, dịch mã hay biểu hiện của gen thông báo, ví dụ *GFP*. Tín hiệu huỳnh quang của GFP ghi lại tại detector khi được kích thích tại 485nm và phát xạ tại 535nm. Cường độ tín hiệu tỷ lệ thuận với nồng độ chất trong môi trường cần phân tích (Hình 5). Chính vì vậy, việc phát triển biosensor mở ra một hướng nghiên cứu mới trong phát hiện và xác định các hợp chất độc hại cho sức khỏe con người, hợp chất có khả năng gây biến đổi gen và ung thư khác như aflatoxin, sterigmatocystin... hoặc các hợp chất chưa được biết đến và chưa được xác định nhưng có tính chất hóa học tương tự MMS (Bui, 2006). Trong khi đó, các phương pháp phân tích hóa lý có thể xác định chính xác các hợp chất đã biết nhưng, không đánh giá được các hợp chất đó có ảnh hưởng về mặt sinh học như gây độc gen, gây độc tế bào. Nhờ ưu điểm này, ngoài việc ứng dụng trong đánh giá và kiểm soát môi trường và thực phẩm, biosensor còn được sử dụng trong sàng lọc được phẩm và phát hiện thuốc mới (Dickson et al., 2004; Martin-Cordero et al., 2013; Rocheville et al., 2013).

5. KẾT LUẬN

Ngưỡng để phát hiện được MMS bằng biosensor được xây dựng và phát triển theo thiết kế này hay nồng độ MMS gây cảm ứng cho promoter *RNR2* hoạt động dẫn đến quá trình biểu hiện của *GFP* là 0,5mM. Trong khi đó các nồng độ menadione từ 6,25 - 50µM không gây kích thích hoạt động và biểu hiện của *RNR2* và *GFP*.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn GS. TS. Stefan Wölfl, Viện Dược và Công nghệ sinh học phân tử (IPMB) – ĐH Heidelberg – Đức đã cung cấp các nguyên liệu cần thiết để xây dựng và

thiết kế biosensor trong quá trình thực hiện nghiên cứu này. Nghiên cứu này, được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED, mã số 106.16-2012.09)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Afanassiev V., Sefton M., Anantachaiyong T., Barker G., Walmsley R., Wolf S. (2000). Application of yeast cells transformed with GFP expression constructs containing the RAD54 or RNR2 promoter as a test for the genotoxic potential of chemical substances. *Mutation research* 464(2): 297-308.
- Benton M.G., Glasser N.R., Palecek S.P. (2007). The utilization of a *Saccharomyces cerevisiae* HUG1P-GFP promoter-reporter construct for the selective detection of DNA damage. *Mutation research* 633(1): 21-34.
- Berg J., Hung Y.P., Yellen G. (2009). A genetically encoded fluorescent reporter of ATP:ADP ratio. *Nature methods* 6(2): 161-166.
- Bergmans H.E., van Die I.M., Hoekstra W.P. (1981). Transformation in *Escherichia coli*: stages in the process. *Journal of bacteriology* 146(2): 564-570.
- Billinton N., Barker M.G., Michel C.E., Knight A.W., Heyer W.D., Goddard N.J., et al. (1998). Development of a green fluorescent protein reporter for a yeast genotoxicity biosensor. *Biosensors & bioelectronics* 13(7-8): 831-838.
- Bladen C.L., Kozlowski D.J., Dynan W.S. (2012). Effects of low-dose ionizing radiation and menadione, an inducer of oxidative stress, alone and in combination in a vertebrate embryo model. *Radiation research* 178(5): 499-503.
- Bui V.N. (2006). Development of novel yeast - based biosensor for cytotoxicity, genotoxicity, and environmental monitoring, Master Thesis - University of Stuttgart - Germany.
- Cahill P.A., Knight A.W., Billinton N., Barker M.G., Walsh L., Keenan P.O., et al. (2004). The GreenScreen genotoxicity assay: a screening validation programme. *Mutagenesis* 19(2): 105-119.
- Castro F.A., Mariani D., Panek A.D., Eleutherio E.C., Pereira M.D. (2008). Cytotoxicity mechanism of two naphthoquinones (menadione and plumbagin) in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS one* 3(12): e3999.
- Chaves G.M., da Silva W.P. (2012). Superoxide dismutases and glutaredoxins have a distinct role in the response of *Candida albicans* to oxidative stress generated by the chemical compounds menadione

- and diamide. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 107(8): 998-1005.
- Daurert S., Barrett G., Feliciano J.S., Shetty R.S., Shrestha S., Smith-Spencer W. (2000). Genetically engineered whole-cell sensing systems: coupling biological recognition with reporter genes. *Chemical reviews* 100(7): 2705-2738.
- Dickson M., Gagnon J.P. (2004). Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. *Nature reviews. Drug discovery* 3(5): 417-429.
- Dinckaya E., Kinik O., Sezginurk M.K., Altug C., Akkoca A. (2011). Development of an impedimetric aflatoxin M1 biosensor based on a DNA probe and gold nanoparticles. *Biosensors & bioelectronics*.
- Đỗ Biên Cương, Đặng Thị Thu (2009). Phương pháp chế tạo kit acetylcholinesterase huyết thanh lợn phát hiện nhanh dư lượng thuốc trừ sâu, 1.6.2009. CShtten (ed) Vol. Bằng độc quyền Giải pháp hữu ích số 771. Việt Nam.
- Froger A., Hall J.E. (2007). Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *Journal of Visualized Experiments* 6(253): doi: 10.3791/3253.
- Garcia-Alonso J, Fakhrullin R.F., Paunov V.N. (2010). Rapid and direct magnetization of GFP-reporter yeast for micro-screening systems. *Biosensors & bioelectronics* 25(7): 1816-1819.
- Gu M.B., Mitchell R.J., Kim B.C. (2004). Whole-cell-based biosensors for environmental biomonitoring and application. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 87: 269-305.
- Gundinc U., Filazi A. (2009). Detection of aflatoxin M1 concentrations in UHT milk consumed in Turkey markets by ELISA. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS* 12(8): 653-656.
- Huang D., Piening B.D., Paulovich A.G. (2013). The Preference for Error-Free or Error-Prone Postreplication Repair in *Saccharomyces cerevisiae* Exposed to Low-Dose Methyl Methanesulfonate Is Cell Cycle Dependent. *Molecular and cellular biology* 33(8): 1515-1527.
- Isarankura-Na-Ayudhya C, Tantimongkolwat T, Galla HJ, Prachayasittikul V (2010). Fluorescent protein-based optical biosensor for copper ion quantitation. *Biological trace element research* 134(3): 352-363.
- Jayaraman M., Radhika V., Bamne M.N., Ramos R., Briggs R., Dhanasekaran D.N. (2005). Engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain BioS-OS1/2, for the detection of oxidative stress. *Biotechnology progress* 21(5): 1373-1379.
- Kitanovic A., Walther T., Loret M.O., Holzwarth J., Kitanovic I., Bonowski F., et al. (2009). Metabolic response to MMS-mediated DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on the glucose concentration in the medium. *FEMS yeast research* 9(4): 535-551.
- Kitanovic A., Wolfl S. (2006). Fructose-1,6-bisphosphatase mediates cellular responses to DNA damage and aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation research* 594(1-2): 135-147.
- Kolosova A.Y., Shim W.B., Yang Z.Y., Eremin S.A., Chung D.H. (2006). Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B1. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. *Analytical and bioanalytical chemistry* 384(1): 286-294.
- Lavrinenko I.A., Lavrinenko V.A., Ryabchenko A.V., Beklemishev A.B. (2006). Development of a biosensor test system with GFP reporter protein for detection of DNA damages. *Bulletin of experimental biology and medicine* 141(1): 33-35.
- Lee N.A., Wang S., Allan R.D., Kennedy I.R. (2004). A rapid aflatoxin B1 ELISA: development and validation with reduced matrix effects for peanuts, corn, pistachio, and Soybeans. *Journal of agricultural and food chemistry* 52(10): 2746-2755.
- Lumjiaktase P., Aguilar C., Battin T., Riedel K., Eberl L. (2010). Construction of self-transmissible green fluorescent protein-based biosensor plasmids and their use for identification of N-acyl homoserine-producing bacteria in lake sediments. *Applied and environmental microbiology* 76(18): 6119-6127.
- Lundin C., North M., Erixon K., Walters K., Jenssen D., Goldman A.S., et al. (2005). Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic acids research* 33(12): 3799-3811.
- Lupo A., Roebuck C., Dutcher M., Kennedy J., Abouzied M. (2010). Validation study of a rapid ELISA for detection of aflatoxin in corn. *Performance Tested Method* 050901. *Journal of AOAC International* 93(2): 587-599.
- Martin-Cordero C., Sanchez-Pico A., Leon-Gonzalez A.J., Perez-Pulido A.J., Daga R.R. (2013). Yeast as a Biosensor of Detoxification: A Tool For Identifying New Compounds That Revert Multidrug Resistance. *Current drug targets*.
- Martineau R.L., Stout V., Towe B.C. (2009). Whole cell biosensing via recA::mCherry and LED-based flow-through fluorometry. *Biosensors & bioelectronics* 25(4): 759-766.
- McCoy L.F., Scholl P.F., Sutcliffe A.E., Kieszak S.M., Powers C.D., Rogers H.S., et al. (2008). Human aflatoxin albumin adducts quantitatively compared by ELISA, HPLC with fluorescence detection, and

- HPLC with isotope dilution mass spectrometry. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 17(7): 1653-1657.
- Mitchell R.J., Gu M.B. (2004). An *Escherichia coli* biosensor capable of detecting both genotoxic and oxidative damage. *Applied microbiology and biotechnology* 64(1): 46-52.
- Paniel N., Radoi A., Marty J.L. (2010). Development of an electrochemical biosensor for the detection of aflatoxin M1 in milk. *Sensors (Basel)* 10(10): 9439-9448.
- Pazos E., Vazquez O., Mascarenas J.L., Vazquez M.E. (2009). Peptide-based fluorescent biosensors. *Chemical Society reviews* 38(12): 3348-3359.
- Petranovic D., Tyo K., Vemuri G.N., Nielsen J. (2010). Prospects of yeast systems biology for human health: integrating lipid, protein and energy metabolism. *FEMS yeast research* 10(8): 1046-1059.
- Piening B.D., Huang D., Paulovich A.G. (2013). Novel Connections Between DNA Replication, Telomere Homeostasis, and the DNA Damage Response Revealed by a Genome-Wide Screen for TEL1/ATM Interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 193(4): 1117-1133.
- Rocheville M., Martin J., Jerman J., Kostenis E. (2013). Mining the potential of label-free biosensors for seven-transmembrane receptor drug discovery. *Progress in molecular biology and translational science* 115: 123-142.
- Rodriguez Velasco M.L., Calonge Delso M.M., Ordonez Escudero D. (2003). ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M(1) in raw cow's milk. *Food additives and contaminants* 20(3): 276-280.
- Rodriguez-Mozaz S., Alda M.J., Marco M.P., Barcelo D. (2005). Biosensors for environmental monitoring A global perspective. *Talanta* 65(2): 291-297.
- Sapsford K.E., Taitt C.R., Fertig S., Moore M.H., Lassman M.E., Maragos C.M., et al. (2006). Indirect competitive immunoassay for detection of aflatoxin B1 in corn and nut products using the array biosensor. *Biosensors & bioelectronics* 21(12): 2298-2305.
- Scudamore K.A., Hetmanski M.T., Clarke P.A., Barnes K.A., Startin J.R. (1996). Analytical methods for the determination of sterigmatocystin in cheese, bread and corn products using HPLC with atmospheric pressure ionization mass spectrometric detection. *Food additives and contaminants* 13(3): 343-358.
- Stocker J., Balluch D., Gsell M., Harms H., Feliciano J., Daunert S., et al. (2003). Development of a set of simple bacterial biosensors for quantitative and rapid measurements of arsenite and arsenate in potable water. *Environmental science & technology* 37(20): 4743-4750.
- Tak Y.K., Naoghare P.K., Lee K.H., Park S.S., Song J.M. (2008). Green fluorescent protein (GFP) as a direct biosensor for mutation detection: elimination of false-negative errors in target gene expression. *Analytical biochemistry* 380(1): 91-98.
- Taniguchi A. (2010). Live cell-based sensor cells. *Biomaterials* 31(23): 5911-5915.
- Vastarella W., Nicastrì R. (2005). Enzyme/semiconductor nanoclusters combined systems for novel amperometric biosensors. *Talanta* 66(3): 627-633.
- Wada K., Taniguchi A., Kobayashi J., Yamato M., Okano T. (2008). Live cells-based cytotoxic sensorchip fabricated in a microfluidic system. *Biotechnology and bioengineering* 99(6): 1513-1517.
- Walmsley R.M., Gardner D.C., Oliver S.G. (1983). Stability of a cloned gene in yeast grown in chemostat culture. *Molecular & general genetics* : MGG 192(3): 361-365.
- Walsh L., Schmuckli-Maurer J., Billinton N., Barker M.G., Heyer W.D., Walmsley R.M. (2002). DNA-damage induction of RAD54 can be regulated independently of the RAD9- and DDC1-dependent checkpoints that regulate RNR2. *Current genetics* 41(4): 232-240.
- Wang H., Nakata E., Hamachi I. (2009). Recent progress in strategies for the creation of protein-based fluorescent biosensors. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 10(16): 2560-2577.
- Wu C.H., Le D., Mulchandani A., Chen W. (2009). Optimization of a whole-cell cadmium sensor with a toggle gene circuit. *Biotechnology progress* 25(3): 898-903.
- Yao D.S., Cao H., Wen S., Liu D.L., Bai Y., Zheng W.J. (2006). A novel biosensor for sterigmatocystin constructed by multi-walled carbon nanotubes (MWNT) modified with aflatoxin-detoxifying enzyme (ADTZ). *Bioelectrochemistry* 68(2): 126-133.