

## NGHIÊN CỨU MÔ HÌNH XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA MỘT SỐ PHÂN ĐOẠN RIP

NGUYỄN THỊ KIM CÚC, NGUYỄN THỊ TUYẾT MAI,  
TRƯƠNG NAM HẢI, LÊ TRẦN BÌNH

*Viện Công nghệ Sinh học*

Các protein bất hoạt ribosom (RIPs) có hoạt tính RNA N-glucosidaza làm mất purin của tiểu phần lớn rRNA và vì vậy làm cho ribosom không có khả năng gắn với nhân tố kéo dài (elongation factor) và kết quả là làm ngừng sinh tổng hợp protein. RIPs chia làm hai nhóm: các protein chuỗi đơn (RIPI) và protein chuỗi đôi (RIPII). Các nghiên cứu về cấu trúc và di truyền cho thấy RIPII tiến hoá từ RIPI. Các protein bất hoạt ribosom loại I thông thường hơn, được chiết xuất và làm sạch từ hơn 30 loại thực vật. Cả hai loại RIPs có hiệu lực như nhau ở các hệ thống ngoài tế bào nhưng có độc tính khác nhau đối với tế bào nguyên vẹn và động vật [3, 11, 16, 17].

Trong cây mướp đắng (*Momordica charantia*) và cây dưa trời (*Trichosanthes sp.* Bắc Cạn 8-98) cũng tồn tại một loại RIP có phân tử lượng 30 KDa và 27 KDa được ký hiệu là MAP30 và Trichobakin (TBK) tương ứng có tính kháng virus [9, 14]. Bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp, gen MAP30 của cây mướp đắng và gen TBK của cây dưa trời được phân lập, lắp ghép vào vector pPIC, pET-21d(+) để biểu hiện trong nấm *Pichia pastoris* và trong vi khuẩn *E.coli* BL21[10, 13].

Việc xác định hoạt tính của MAP30 và TBK đang được tiến hành trên nhiều đối tượng như vi khuẩn, virus và tế bào nuôi cấy. Báo cáo này trình bày kết quả sử dụng các phương pháp khác nhau để xác định hoạt tính kháng khuẩn của một số phân đoạn RIP tách chiết từ tự nhiên và tái tổ hợp có nguồn gốc thực vật.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Vật liệu:

Các phân đoạn Trichobakin: NQV18, NMB15 nhận được từ cây dưa trời (*Trichosanthes sp.*), được tinh sạch qua cột trao đổi ion, có trọng lượng phân tử 27 KDa.

Các phân đoạn MAP30: A, B, C nhận được bằng chủng nấm *Pichia pastoris* tái tổ hợp mang gen MAP30 của cây mướp đắng (*Momordica charantia*).

Các chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* DM201, *Bacillus subtilis* ATCC 9/58, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 nhận được từ Viện Kiểm nghiệm, Bộ Y tế. Chủng *E.coli* DH5 $\alpha$  - từ Viện Công nghệ sinh học.

#### 2. Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn:

- Phương pháp khuếch tán trong thạch: Đục lỗ đường kính 3 mm trên bề mặt thạch đã được cấy dịch vi khuẩn. Nhỏ dung dịch RIP vào các lỗ, ủ đĩa thạch ở nhiệt độ thích hợp với từng vi sinh vật kiểm định. Sau 24 giờ, xác định vùng vô khuẩn.

- Phương pháp tế bào khả biến (theo Sambrook và cs., 1989): Chủng *E.coli* DH5 $\alpha$  sau khi được xử lý với CaCl<sub>2</sub>, ủ với RIP trong đá 30 phút, sốc nhiệt, lắc trong môi trường lỏng một giờ, sau đó cấy trải ra môi trường thạch. Sau 24 giờ, quan sát sự phát triển của vi khuẩn.

\* Công trình này được sự tài trợ kinh phí của chương trình nghiên cứu cơ bản.

- Phương pháp khuếch tán: Để loại khả năng một số peptit có thể liên kết với thành phần đa anion (polyanionic compounds) của thạch và như vậy làm giảm hoạt tính sinh học của protein, chúng tôi thay thạch bằng agarose và thí nghiệm được đặt tương tự như phương pháp 1. Vì lượng dinh dưỡng ở lớp dưới bị hạn chế nên một lớp thạch giàu dinh dưỡng được phủ lên trên đĩa thạch sau 3 giờ nuôi cấy.

- Phương pháp tế bào trần (theo Sambrook và cs., 1989, có cải tiến). Các chủng vi khuẩn kiểm nghiệm sau khi được xử lý bằng lysozym để loại thành tế bào, kiểm tra sự tạo tế bào trần dưới kính hiển vi. Nếu 80-90% tế bào trần được tạo thành, dừng phản ứng. Ủ tế bào trần với RIP trong đá 20 phút, nồng độ NQV18 115mg/ml và của NMB15 là 155 mg/ml. Cân bằng hỗn hợp 15 phút ở nhiệt độ phòng và cấy trải ra môi trường thạch. Sau 24 giờ, quan sát sự phát triển của vi khuẩn, đếm số khuẩn lạc trên môi trường.

Phương pháp này cần hai đối chứng :

- + ĐC1 - tế bào nguyên vẹn ủ với RIP
- + ĐC2 - tế bào trần không ủ với RIP

### 3. Phương pháp xác định hoạt tính proteaza:

Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 1% casein. Nuôi ở nhiệt độ thích hợp, sau hai ngày xác định vòng phân giải.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Xác định hoạt tính proteinaza ngoại bào của các chủng vi khuẩn thử nghiệm:

Bản chất của RIP là một protein, vì vậy chúng tôi phải xác định được liệu các chủng vi khuẩn thử nghiệm có khả năng phân huỷ RIP không, trước khi chúng có thể xâm nhập vào bên trong tế bào.

Kết quả nhận được cho thấy chủng *Bacillus subtilis* ATCC 9/58 có hoạt tính proteinaza ngoại bào, nhưng rất yếu (bảng 1).

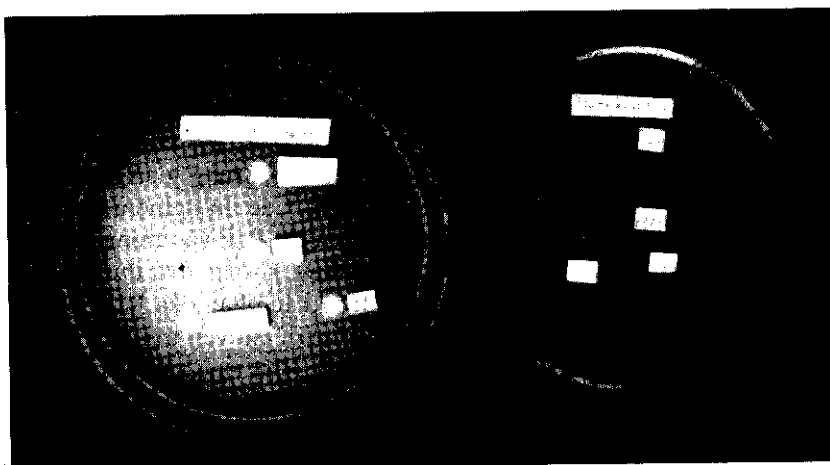
Bảng 1

Hoạt tính proteinaza ngoại bào của các chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	Hoạt tính proteinaza
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DM201	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9/58	±
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	-
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$	-

### 2. Xác định hoạt tính kháng khuẩn của các phân đoạn RIP:

Bằng các phương pháp 1, 2, 3, tế bào vi khuẩn không được xử lý trước hoặc được xử lý để tạo thành tế bào khả biến như trong trường hợp của *E.coli* DH5 $\alpha$ , các chủng vi khuẩn vẫn phát triển bình thường sau 24 giờ nuôi cấy, vì vậy không thể áp dụng để xác định hoạt tính của RIP (ảnh).



Ảnh. Tế bào *P. aeruginosa* (trái) và *Micrococcus luteus* (phải) sau khi xử lý với Rip

Sử dụng phương pháp tạo tế bào trần, sau đó xử lý chúng với các phân đoạn RIP, kết quả nhận được là các protein này đã ức chế sự phát triển của các chủng vi khuẩn nghiên cứu.

Bảng 2

**Hoạt tính ức chế tái sinh khuẩn lạc từ tế bào trần vi khuẩn của các phân đoạn RIP**

Các phân đoạn RIP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DM201		<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9/58	
	CFU/ml	% ức chế	CFU/ml	% ức chế
ĐC1	2,89.10 <sup>6</sup>	0	4,75.10 <sup>7</sup>	0
ĐC2	3,03.10 <sup>5</sup>	0	5,52.10 <sup>6</sup>	0
NQV18	2,80.10 <sup>5</sup>	8	4,86.10 <sup>6</sup>	12
NMB15	2,42.10 <sup>5</sup>	20	3,25.10 <sup>6</sup>	41
A	2,54.10 <sup>5</sup>	16	4,06.10 <sup>6</sup>	26,5
B	2,52.10 <sup>5</sup>	16,8	4,40.10 <sup>6</sup>	20,3
C	2,60.10 <sup>5</sup>	14	3,20.10 <sup>6</sup>	42

\* CFU: Khuẩn lạc

Bảng 2 cho thấy, trong điều kiện nuôi cấy có mặt RIP, một tỉ lệ đáng kể tế bào trần không tái sinh được thành tế bào và chết. Lượng tế bào trần có khả năng phát triển sau khi được ủ với RIP đều giảm trong tất cả các lô thí nghiệm, đặc biệt là đối với chủng *Bacillus subtilis*, số tế bào sống sót giảm tới 40% sau khi bị xử lý với các phân đoạn NMB15 và C.

Một số nghiên cứu cho thấy RIP có trọng lượng phân tử 30 KDa tách từ hạt lúa mạch, có thể tham gia vào quá trình ức chế sự nhiễm bệnh ở cây. Protein này ức chế ribosom của nấm hiệu quả hơn so với ribosom của tế bào động vật. RIP có thể hoạt động theo những cơ chế kháng nấm rất khác nhau [12, 15]. Có rất ít những nghiên cứu về hiệu ứng của RIP lên ribosom procaryot và eucaryot bậc thấp. Những báo cáo về khả năng kháng ricin của ribosom *E.coli* và *Tetrahymena pyriformis* đã tạo cảm giác rằng ribosom từ các loài trong giới đơn bào (protista kingdom) có thể là cơ chất không thích hợp cho hoạt động của RIP [15].

Theo Endo và cs.[2], ribosom của các cơ thể khác nhau có độ mẫn cảm khác nhau đối với RIP. Như vậy, tác động qua lại RIP-ribosom phức tạp hơn chứ không đơn giản là nhận biết cấu trúc bậc I của RNA. Ngoài ra, cũng có thể những sự khác biệt này là do điều kiện thí nghiệm khác nhau như nguồn enzym, các điều

kiện ion, cofactor ... [1, 5, 6, 7]. Điều này cũng được phản ánh qua các kết quả thí nghiệm trên.

Cơ chế đi vào trong tế bào của RIPI chưa được khẳng định chắc chắn mà chỉ là những giả thuyết. RIP có thể đi vào trong tế bào qua hai cơ chế: nội thực bào (endocytosis) phụ thuộc vào việc dính RIP với các gốc galactosyl (RIPII) hoặc chất thụ cảm mannoza (mannoza receptors) trên màng tế bào và fluid-phase endocytosis cho phép phân tử đi vào trong mà không qua cơ chế trung gian là tế bào tiếp nhận [1, 16]. Gốc glycosyl có trong phần lớn RIPI và có thể sẽ gắn với hydrat cacbon nhận trên màng tế bào. Nhưng các loại RIPI, có thể được tiếp nhận vào trong tế bào bằng fluid-phase endocytosis mà không qua chất thụ cảm (receptor) cho gốc glycosyl có trong phân tử RIPI. Độc tính đối với tế bào của RIPI thấp hơn so với RIPII, có thể là do sự tiếp nhận thông qua chất thụ cảm trung gian không có hiệu quả cho loại RIPI. Các thí nghiệm khác nhau chỉ ra rằng sự tiếp nhận RIP vào trong tế bào bằng các cách khác nhau, không nhất thiết là nguyên nhân mức độ độc khác nhau của RIPI mà có thể đó là do quá trình di chuyển trong tế bào của chúng khác nhau [4]. Như vậy, vấn đề quan trọng đầu tiên là làm thế nào để RIPs có thể thâm nhập vào bên trong tế bào. Theo một số tác giả [8], hiệu ứng ức chế sự phát triển của nấm bệnh như *Trichoderma reesei*, *Fusarium sporotrichoides*

*Rhizoctonia solani* ... tăng lên gấp nhiều lần khi có sự tham gia đồng thời của chitinaza, 1,3- $\alpha$ -glucanaza và RIP. Hai enzym đầu có tác dụng làm thay đổi màng tế bào của nấm và giúp cho RIP đi vào nguyên sinh chất. Trong thí nghiệm này, chúng tôi đã sử dụng lysozym để đạt được mục đích trên. Như vậy, tác dụng ức chế tái sinh khuẩn lạc từ tế bào trần không đơn thuần là ức chế tái sinh thành tế bào, mà có thể liên quan trực tiếp tới hoạt động của RIP sau khi đã thâm nhập vào trong tế bào.

Một trong những chức năng sinh học có ý nghĩa nhất của RIP là bảo vệ cây khỏi sự tấn công của vi sinh vật gây bệnh [10, 13]. Đặc tính này của RIP có thể được khai thác và sử dụng hiệu quả trong y học để phòng chống một số bệnh hiểm nghèo như ung thư, AIDS; trong trồng trọt, để kiểm soát dịch bệnh. Vì vậy, việc đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của RIP cũng như tìm ra mô hình xác định hoạt tính này là cần thiết và có tiềm năng ứng dụng trong thực tế.

### III. KẾT LUẬN

- Tế bào trần của vi khuẩn là mô hình thích hợp để xác định hoạt tính kháng khuẩn của các phân đoạn RIPI tự nhiên và tái tổ hợp NQV18, NMB15, A, B, C.

- Các phân đoạn NMB15 và C thể hiện hoạt tính cao đối với tế bào trần của *Bacillus subtilis*: lượng tế bào trần sống sót giảm tới 40% sau khi bị xử lý với chúng.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Barbieri L., Battelli M. G., Stirpe F., 1993: Biochim. Biophys. Acta, 1154: 277-287.
2. Endo Y. et al., 1982: Biol.Chem., 257: 9051-9057.
3. Goldmacher V. S. et al., 1989: Mol. Pharmacol., 36: 818-822.
4. Habuca N. et al., 1990: J. Biol. Chem., 265: 10988-10992.
5. Habuca N. et al., 1991: J. Mol. Biol., 221: 737-743.
6. Jimenez A., Vazquez D., 1985: Annu. Rev. Microbiol., 39: 649-672.
7. Leah R. et al., 1991: J. Biol. Chem., 266: 1564-1573.
8. Lee-huang et al., 1995: Gene, 164: 151-156.
9. Nguyen Van Dat et al., 2000: Trong: "Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong sinh học": 44-47, NXB Đại học Quốc gia, Hà Nội.
10. Pestle J. et al., 1992: Nucl. Acids Res., 20: 3179-3182.
11. Phan Van Chi et al., 2000: Trong: "Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong sinh học": 23-28, NXB Đại học Quốc gia, Hà Nội.
12. Shaw P.C. et al., 1991: Gene, 97: 267-272.
13. Taylor B. E. Irvin J. D., 1990: FEBS letters, 273: 144-146.
14. Van Chi P. et al., 2001: Biotechnol. Appl. Biochem., 34(3): 85-92.
15. Walden K. R., Claude P. S., 1986: Biochimica et Biophysica Acta, 880: 161-170.
16. Xia X., Wang F., Sui S., 2001: Biochim. Biophys. Acta, 1515 (1): 1-11.
17. Xie L. et al., 2001: Eur. J. Biochem., 268 (22): 5723-5733.

## TESTING OF THE BACTERIAL CULTURE SYSTEMS FOR THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY DETERMINATION OF SOME RECOMBINANT RIPS

NGUYEN THI KIM CUC et al.

### SUMMARY

Four bacterial culture systems were used for the determination of the antibacterial activity of some recombinant RIPS, obtained by the overexpression of the corresponding genes isolated from *Trichosanthes* and *Momordia* in *E.coli* and *P.pastoris*. The results showed that the investigated fractions of RIPI inhibited the growth of the bacterial protoplasts but not the intact cells. The protoplasts generated from two bacterial strains *P. aeruginosa* and *B.subtilis* were inhibited by all the investigated fractions, especially by the fractions NMB15 and C which have reduced the survival *B.subtilis* protoplasts to 40%.

Ngày nhận bài: 17-11-2000