

NỘI ĐỘC TỔ VÀ PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH

LÊ QUANG HUẤN, LÊ XUÂN TÚ

Viện Công nghệ sinh học

Nội độc tố (endotoxin) là một lipopolysaccharit (LPS), được phân bố ở bề mặt thành tế bào vi khuẩn gram âm và là một chất rất bền với nhiệt, nó không dễ dàng bị phá hủy bằng khử trùng hơi. Nội độc tố là một tác nhân quan trọng trong nhiều quá trình bệnh lý, trong công nghiệp dược và công nghiệp thực phẩm. Thực tế, nội độc tố có mặt trong mọi nơi. Tuy nhiên, nó chỉ thực sự nguy hiểm khi xâm nhập vào hệ thống tuần hoàn, dù một lượng nhỏ 10^{-6} g cũng rất nguy hiểm, thậm chí gây tử vong. Do đó, các loại thuốc, nhất là thuốc tiêm, dịch truyền phải có biện pháp kiểm tra nghiêm ngặt về độ sạch để đảm bảo thuốc sản xuất ra không chứa nội độc tố. Trong quá trình sản xuất thuốc, tất cả các tế bào vi khuẩn có thể được loại bỏ và thuốc có thể kiểm tra là vô trùng, tuy nhiên vấn đề chỉ nhiệt tố vẫn có thể tồn tại. Vì vậy, thuốc sản xuất ra (ngoại trừ thuốc sử dụng theo đường tiêu hóa) phải được kiểm tra sự có mặt của LPS và quy trình kiểm tra này được tiến hành trên thỏ. Phương pháp này rất tốn kém và có độ chính xác không cao. Năm 1956, các nhà khoa học đã phát hiện những đặc tính quý giá của máu sam: Khả năng tạo gel khi có mặt nội độc tố của vi khuẩn gram âm, thậm chí với hàm lượng nội độc tố rất thấp (10^{-9}). Nhờ đó dịch chiết máu sam nhanh chóng được sử dụng để xác định nội độc tố trong các chế phẩm sinh, dược, trong các sản phẩm của công nghiệp thực phẩm cũng như việc xác định sự nhiễm độc máu, mà đặc biệt là xác định các vi khuẩn gây nên các bệnh hiểm nghèo như bệnh viêm màng não, viêm gan, bệnh lậu.... Ở Mỹ, theo quy định của Tổ chức dược phẩm và thực phẩm, việc kiểm tra nội độc tố bằng chế phẩm LAL- là bắt buộc; ở châu Âu, chế phẩm này cũng đã được ghi vào dược điển. Chế phẩm từ máu sam dùng để xác định nội độc tố được gọi là LAL-Reagent và phép thử này được gọi là LAL-Test.

Trong bài này, chúng tôi trình bày những kết

quả nghiên cứu tách chiết nội độc tố từ *E.coli* LT:2 và sử dụng LAL tách từ sam biển nhằm xây dựng phương pháp xác định nội độc tố trong các chế phẩm sinh, dược và trong y học.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu:

E.coli LT:2 được nuôi cấy trong bình lên men và thu nhận ở giai đoạn mà nồng độ tế bào đạt $3-8.10^8$ /ml. Nguồn cacbon được sử dụng trong nuôi cấy là Tris-base pH = 7,5 trong môi trường trung tính tối thiểu với glucô.

Sam trưởng thành thuộc loài *Tachypleus tridentatus*, có trọng lượng 6-8 kg, được thu nhận tại vùng biển Sầm Sơn, Thanh Hóa. Các hóa chất thí nghiệm đều là loại tinh khiết (Pháp), nước cất không có chỉ nhiệt tố (Viện Nhi Thụy Điển và CHLB Đức), LAL-Test và nội độc tố chuẩn của Mỹ.

Dụng cụ thủy tinh phải được khử trùng, sấy sao cho không có chỉ nhiệt tố và đều được tráng silicon.

2. Phương pháp:

a) Tách LPS

Sinh khối tế bào *E.coli* LT:2 được rửa 2 hoặc 3 lần bằng 30 ml 0,12 M Tris-HCl, pH = 8. Sau đó, đun nóng (37°C) trong dung dịch đệm với sự bổ sung 0,01 M EDTA thời gian 4 phút và cho thêm MgCl_2 sao cho nồng độ cuối cùng là 0,05 M, ly tâm 10.000 vòng/phút trong 20 phút. Dịch ly tâm được lọc qua màng (màng có kích thước lỗ $0,45 \mu$). Dịch ly tâm sau khi lọc, được thẩm tích ở 4°C với dung dịch 0,1 M sodium photphat, pH = 7 trong 24 giờ sau đó là nước cất 48 giờ. Phần không thẩm tích được đông khô.

Tế bào *E.coli* LT:2 được hòa trong axêton, khuấy nhẹ và để lắng ở 0°C thời gian 10 phút.

Axêton được loại bỏ bằng ly tâm. Tế bào được hòa lại trong 25 ml H₂O và chiết với 90% phenol ở 68°C. Lớp phenol được chiết lại với nước, dịch chiết nước được thẩm tích ở 4°C trong 48 giờ và đông khô phân không thẩm tích.

b) Tách chiết *Limulus Amoebocyte lysate*:

Tách chiết LAL theo phương pháp của Jorgensen và Smith (1973), Reinhold và Fine (1971).

Máu sam (*Tachypleus tridentatus*) được hút trực tiếp vào dung dịch đệm (0,125% n-ethylmaleinmit trong dung dịch 0,9% NaCl; 0,95% EDTA trong 0,9% NaCl) theo tỷ lệ 1: 1. Sau khi lắc nhẹ, dung dịch được ly tâm 600 vòng/phút trong 10 phút. Các tế bào amoebocyte được rửa lại 2 lần với dung dịch muối không chứa NEM (hoặc EDTA). Sau đó, các tế bào amoebocyte được thủy phân trong nước không chứa chỉ nhiệt tố theo tỉ lệ 1 : 3 (1 phần thể tích tế bào: 3 phần nước) ở 4°C, sau 24 giờ ly tâm 2000 vòng/phút để loại bỏ xác tế bào. Dịch ly tâm được đông khô để thu LAL.

3. Phương pháp xác định nội độc tố:

Hòa 0,1 ml mẫu cần thử vào ống nghiệm (10 × 75 mm) chứa 0,1 ml LAL. Các ống đối chứng

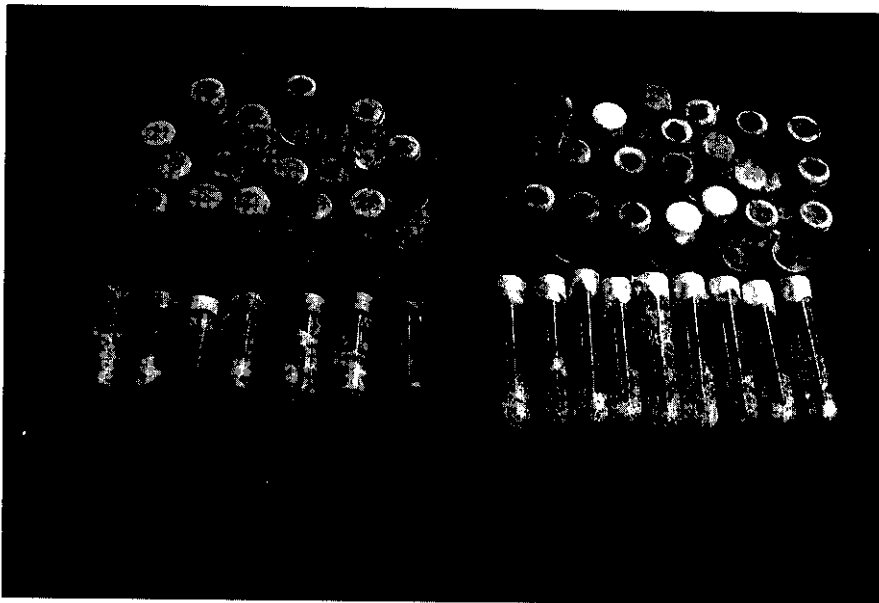
bao gồm một ống chứa 0,2 ml LAL, một ống chứa 0,1 ml LAL và 0,1 ml dung dịch muối NaCl 0,9%. Các ống nghiệm được lắc đều và để lắng ở 37°C trong khoảng thời gian 1 giờ, nội độc tố trong mẫu thử được đánh giá theo mức độ và chất lượng của gel hình thành.

Các mẫu có nồng độ LPS khác nhau được rót vào ống nghiệm có chứa LAL đã pha loãng (20-22 lần so với phép thử tạo gel), lắc nhẹ và xác định độ đục của dung dịch bằng phổ hấp thụ ở bước sóng 360 nm.

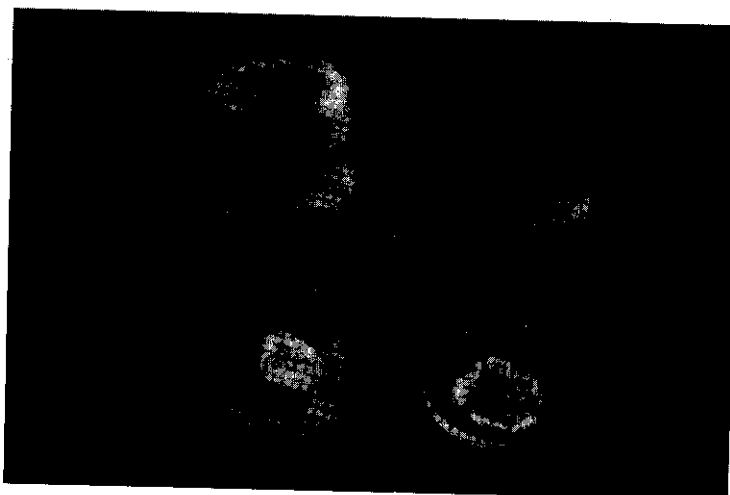
II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sử dụng các dung môi: phenol hoặc EDTA để tách LPS từ *E.coli* LT:2 đều cho kết quả tốt (ảnh 1). Xác định khả năng tạo gel với LAL tách chiết từ loài *Tachypleus tridentatus* vào khoảng thời gian từ tháng 6/97 đến tháng 10/97.

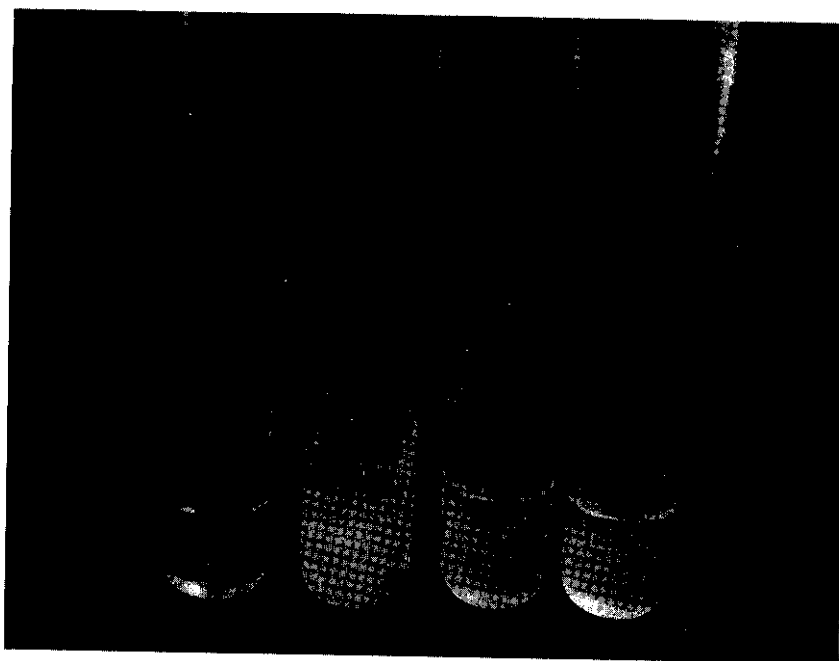
Kết quả thử nghiệm (ảnh 2, ảnh 3) cho thấy: chế phẩm LAL tạo gel tốt khi thử nghiệm với mẫu nội độc tố của *E.coli* LT:2 có hàm lượng LPS là 10⁻⁷ g/ml. Chế phẩm LAL của Ward (1972), Reinhold và Fine (1971) có hoạt tính từ 10⁻¹⁰ g/ml tới 10⁻¹² g/ml, điều này có thể giải thích rằng trong chế phẩm còn chất ức chế sự tạo gel.



Anh 1. Các chế phẩm LAL sau khi đông khô



Ảnh 2. Lipopolisaccharid (LPS) tách từ *E.coli* LT:2



Ảnh 3. Chế phẩm LAL tạo gel với LPS của *E.coli* LT:2

A1: Hàm lượng LPS là 10^7 g/ml

A2: Hàm lượng LPS là 10^6 g/ml

A3: Hàm lượng LPS là 10^5 g/ml

K: Ống chuẩn

Sử dụng phương pháp quang phổ để xác định độ đục của chế phẩm cho thấy: phổ hấp thụ của mẫu tăng khi hàm lượng nội độc tố trong mẫu tăng (bảng 1). Như vậy, có thể sử dụng phương pháp này để xác định nhanh sự có mặt của nội độc tố trong các chế phẩm cần phải thử nghiệm (vì không phải ủ dung dịch ở 37°C trong 60 phút, mà ngay sau khi cho dịch LAL đã pha loãng của mẫu thử, ta có thể xác định lượng nội độc tố bằng phổ hấp thụ) và nhờ đó, ta định lượng được nội độc tố trong mẫu thử nghiệm.

Độ hấp thụ của các mẫu với các hàm lượng LPS khác nhau

Nồng độ LPS \ Bước sóng	A	B	C	D	E
$\lambda = 360 \text{ nm}$	0,306470	2,059036	1,538574	1,06702	0,306473

III. KẾT LUẬN

1. Quy trình tách chiết nội độc tố phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm và có thể xác định sự có mặt của nội độc tố khi sử dụng LAL-dịch chiết từ máu sam thuộc loài *Tachypleus tridentatus*.

2. Chế phẩm LAL tách chiết theo phương pháp trên có hoạt tính 10^{-7} g/ml. Sử dụng NEM làm chất chống đông, chế phẩm LAL có hoạt tính cao hơn so với chế phẩm thu được khi sử dụng EDTA.

3. Sử dụng phương pháp xác định nội độc tố

bằng sự tạo gel với LAL là một phương pháp nhanh và có độ chính xác cao. Tuy nhiên, khi sử dụng cùng với phương pháp quang phổ, ta có thể xác định nội độc tố nhanh hơn và đồng thời có thể định lượng nội độc tố.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nakamura S. et al., 1976: J. Biochem., 80: 1011-1021.
2. Jorgensen J. F. et al, 1973: App. Micro, 26(1): 38-42.
3. Sullivan J. R. and Watson S. W., 1974: App. Micro., 28(6): 1023-1026.

ENDOTOXIN AND DETECTION METHOD

LE QUANG HUAN, LE XUAN TU

SUMMARY

The mixture of the *Limulus amoebocyte lysate* and the endotoxin obtained was examined for the gel formation (to add 0.1 ml of the aqueous endotoxin solution to 0.1 ml of the lysate, incubation of the mixture at 37°C for 1 hour). The results showed that this lysate could be used to detect the endotoxin with the concentration 10^{-7} g/ml. The use of the *Limulus amoebocyte lysate* could detect the endotoxin with the turbidity at 360 nm.

Ngày nhận bài: 15-12-1999