

NGHIÊN CỨU TẠO PHỨC HỢP CHROMATOPHORE - CHẤM LƯỢNG TỬ (QUANTUM DOTS) ĐỂ TẠO BIOSENSOR PHÁT HIỆN CÁC TÁC NHÂN GÂY BỆNH

Nguyễn Thị Hoa*, Vũ Thị Hiền*, Ứng Thị Diệu Thúy**, Nguyễn Quang Liêm**, Đinh Duy Khánh*, Đồng Văn Quyển*

TÓM TẮT:

Công nghệ nano hiện đang là một trong những ngành khoa học mũi nhọn ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau, đặc biệt khi kết hợp với công nghệ sinh học, mở ra kỷ nguyên mới trong nghiên cứu y-sinh học. Nhiều tác nhân gây bệnh trong cơ thể, vi sinh vật gây hại trong môi trường, độc tố trong thực phẩm... đã được xác định chính xác nhờ kết hợp kỹ thuật trong công nghệ vật liệu nano và công nghệ sinh học. Tiếp theo nghiên cứu sản xuất kháng thể kháng β -subunit tái tổ hợp, trong nghiên cứu này chúng tôi thông báo kết quả tạo phức hợp chromatophore từ vi khuẩn lila *Rhodospirillum rubrum* với chấm lượng tử (quantum dots-QDs). Đây là các cấu phần thiết yếu để phát triển biosensor Tế bào vi khuẩn *R. rubrum* được phá vỡ bằng máy phá áp lực French press kết hợp siêu âm để giải phóng chromatophore. Sau khi tinh chế bằng ly tâm siêu tốc gradient nồng độ sucrose, chromatophore tại các phân đoạn được kiểm tra bằng kính hiển vi điện tử với độ phóng đại 15.000X - 30.000X. Kết quả cho thấy chromatophore có dạng hình tròn dẹt, kích thước khoảng 100 nm, với độ tinh sạch cao. Chromatophore tinh sạch sau đó được trộn với chấm lượng tử màu đỏ, kích thước 2-3 nm, trong điều kiện thích hợp để tạo phức hợp chromatophore-QDs. Sự tạo thành phức hợp được khẳng định bằng kiểm tra cường độ phát quang dưới kính hiển vi huỳnh quang. Phức hợp này sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo để phát triển biosensor.

Từ khóa: Công nghệ nano, Chromatophore, chấm lượng tử (quantum dots-QDs), biosensor.

SUMMARY:

GENERATION OF COMPLEX OF COTE QUANTUM DOT AND CHROMATOPHORE - THE ESSENTIAL REQUIREMENT FOR BIOSENSOR DEVELOPMENT

Following the research on production of antibody against recombinant β -subunit of FOF1-ATPase, in this study we reported the generation of complex of chromatophore extracted from *Rhodospirillum rubrum* with quantum dots; these are essential requirements for biosensor development. *R. rubrum* cells were disrupted by French pressure combines ultrasonication to release the chromatophore. Chromatophore was purified by density-gradient ultracentrifugation. The pigmented bands were collected and examined by electron microscope with magnification of 15.000X - 30.000X. The results showed that chromatophore shaped like discs and cups 100 nm in diameter. The highly purified chromatophore was then mixed with red QDs, 2-3 nm in size, in suitable conditions to form complex of chromatophore-QDs. The formation of complexes was confirmed by luminescence intensity under fluorescent microscope. The complex will be used for further research to develop the biosensor.

Key word: nanotechnology, Quantum dot, chromatophore, biosensor

I. ĐẶT VẤN ĐỀ:

Chấm lượng tử (QDs) là những tinh thể bán dẫn, được tạo nên từ các vật liệu nhóm II-VI (CdSe) hoặc III-V (InP) trong bảng hệ thống tuần hoàn (Alivisatos et al., 2005), có kích thước nanomet (< 10 nm). Cùng một

* Viện Công nghệ sinh học, ** Viện Khoa học vật liệu

chất nhưng những chấm lượng tử có kích thước khác nhau sẽ phát xạ ra các màu khác nhau dưới ánh sáng hồng ngoại hoặc tử ngoại. Khi bị kích thích, QDs càng nhỏ thì năng lượng và cường độ phát sáng của nó càng tăng. Vì vậy, QDs là vật liệu được sử dụng hàng loạt trong những áp dụng kỹ thuật mới như đánh dấu huỳnh quang y-sinh, linh kiện quang điện tử, pin mặt, linh kiện chiếu sáng rắn [2,10].

F0F1-ATPase trong chromatophore hoạt động như một "động cơ" quay sinh học kích thước nano, có khả năng dẫn truyền năng lượng. Khi proton chảy qua F0, ATP sẽ được tổng hợp từ ADP và phosphate vô cơ trong F1 nhờ nguồn năng lượng sinh ra bởi sự chuyển động của dòng proton; trong khi đó quá trình thủy phân ATP trong F1 lại cung cấp năng lượng để bơm proton ngược trở lại qua F0 [5,7]. Dựa vào đặc tính này mà F0F1-ATPase được sử dụng để phát triển biosensor chẩn đoán bệnh.

Gần đây các nhà nghiên cứu đã kết hợp QDs với chromatophore để tạo nên các biosensor có khả năng phát hiện nhiều loại virus gây bệnh như cúm A/H5N1, H9N1 hay chẩn đoán các bệnh ung... với độ nhạy và độ đặc hiệu vượt trội [4,6,9]. Những kết quả nghiên cứu này mở ra triển vọng ứng dụng động cơ F0F1-ATPase, chấm lượng tử tạo biosensor để phát hiện các yếu tố gây bệnh ở mức độ phân tử.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi mô tả quy trình tách chiết và tinh sạch chromatophore từ vi khuẩn tía và nghiên cứu quy trình gắn QDs trên bề mặt của tế bào sắc tố chromatophore. Kết quả này là tiền đề quan trọng tiền tới phát triển thành công các biosensor dùng để phát hiện tác nhân gây bệnh như virus, vi khuẩn, các dấu ấn ung thư... với độ nhạy và độ đặc hiệu cao.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU:

Vật liệu

- Tế bào vi khuẩn *Rhodospirillum Rubrum* mua từ Home Science Tools, Mỹ.

- Chấm lượng tử CdTe được cung cấp bởi Viện Khoa học vật liệu, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phương pháp nghiên cứu

Nuôi vi khuẩn *Rhodospirillum Rubrum*

Vi khuẩn *Rhodospirillum Rubrum* được nuôi cấy trên môi trường DSMZ-27, thời gian 8 ngày, trong điều kiện kỵ khí (Stanley, 1965).

Tách chiết chromatophore từ *Rhodospirillum rubrum*

Chromatophore được tách chiết và tinh sạch theo Stanley C. Holt (1965). Dịch nuôi cấy tế bào được ly tâm 4.200 vòng/phút trong 30 phút, thu sinh khối tế bào. Rửa sinh khối 2 lần bằng đệm phosphate 0,02 M chứa MgSO₄ 0,01 M, sau đó hòa lại trong đệm phosphate theo tỷ lệ 5mg trọng lượng khô/ml đệm phosphate 0,2 M chứa MgSO₄ 0,01 M. Tiếp theo tế bào bị phá bởi máy phá áp lực French press và siêu âm. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, loại xác tế bào và thu dịch nổi. Tiếp theo, dịch tế bào được ly tâm siêu tốc ở 104.000g/phút trong 60 phút, thu cận tế bào. Hòa lại cận trong đệm phosphat 0,2 M chứa MgSO₄ 0,01 M và tiến hành ly tâm siêu tốc gradient sucrose với thang nồng độ 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75 và 2M ở tốc độ 30.000 vòng/phút trong 90 phút.

Lai Western

Chromatophore (5-15 µg) chứa F0F1-ATPase tách chiết ở trên được phân tách trên gel 12% polyacrylamide, sau đó chuyển sang màng PVDF. Màng được phủ qua đêm ở 4°C bằng sữa tách bơ (skim milk) 5% pha trong đệm TBS. Sau khi rửa với TBST (TBS + 0.1% Tween 20), màng được ủ với kháng thể kháng β-subunit (anti-Fabs), sau đó ủ với

kháng thể 2 (cộng hợp kháng IgG thô gắn HRP). Cuối cùng ủ màng trong dung dịch chất hiển màu (methanol + chất hiển màu + H₂O₂) trong 10 phút và đọc kết quả.

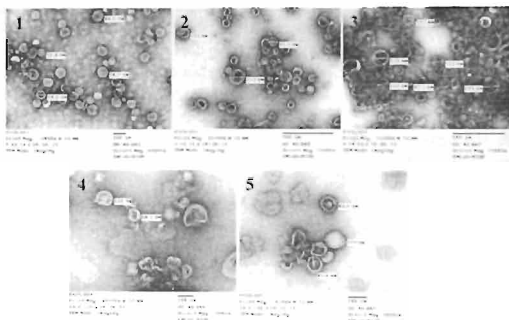
Tạo phức hợp chromatophore-quantum dots

Hút 100 µl Chromatophore (nồng độ 0,4 mg/ml) vào ống eppendorf. Ly tâm 12000 vòng/phút trong 30 phút, loại dịch. Hòa cạn lại trong 100 µl đệm A (50 mM Tricine, 5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, pH 6,5). Bổ sung 40 µl CdTe (nồng độ 2,5x10¹⁵ hạt/µl) → ủ 3 giờ tại nhiệt độ phòng. Ly tâm 12000 vòng/phút trong 30 phút, thu cạn. Rửa cạn 3 lần bằng đệm Tricine 50 mM pH 6,5. Hòa cạn lại trong 100 µl đệm Tricine 50 mM pH 6,5. Bảo quản ở 4°C.

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN:

Tách chiết chromatophore từ vi khuẩn *R. rubrum*

Vi khuẩn *R. rubrum* được nhân giống và nuôi cấy như mô tả ở trên. Chromatophore được tách chiết và tinh sạch bằng phương pháp ly tâm siêu tốc gradient nồng độ sucrose. Các phân đoạn thu nhận chứa chromatophore được kiểm tra trên kính hiển vi điện tử với độ phóng đại 15.000X - 30.000X. Kết quả (hình 1) cho thấy chromatophore có dạng hình tròn dẹt, kích thước khoảng 100 nm. Kết quả này cũng tương tự như công bố trong nghiên cứu của Stanley C. Holt (1965).

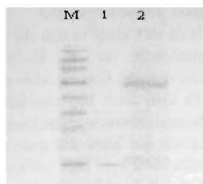


Hình 1. Ảnh kính hiển vi điện tử (TEM) chromatophore tinh sạch từ *R. rubrum* của 5 phân đoạn khác nhau sau tinh chế. Độ phóng đại 15.000X-30.000X.

Qua hình chúng ta thấy, chromatophore có mặt ở tất cả các phân đoạn trong quá trình tinh chế. Tuy nhiên, phân đoạn 1 và 2 có độ tinh sạch cao và có mật độ chromatophore nhiều hơn. Vì vậy, chúng tôi thu 2 phân đoạn này lại để sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo, các phân đoạn còn lại được tiến hành tinh sạch lần hai bằng ly tâm siêu tốc

gradient nồng độ sucrose để thu nhận chromatophore tinh sạch.

Để tạo biosensor, chromatophore phải nguyên vẹn và giữ được hoạt tính sinh học. Nói cách khác, chúng vẫn còn khả năng tổng hợp ATP từ ADP và phosphate vô cơ và ngược lại. Chức năng này được thực hiện nhờ F₀F₁-ATPase trong chromatophore.



Hình 2. Kết quả Western blot kiểm tra sự nguyên vẹn của chromatophore. Protein β -subunit tái tổ hợp (giếng 1) và chromatophore tinh sạch (giếng 2) được chạy điện di phân tách trên gel polyacrylamide 12 %, chuyển sang màng PVDF và nhuộm với kháng thể kháng β -subunit tái tổ hợp.

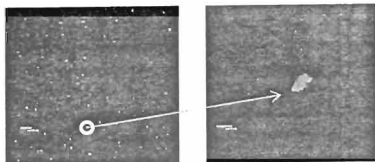
Nguyên lý hoạt động của biosensor mà chúng tôi đang nghiên cứu đó là kết hợp khả năng phát quang tại các bước sóng nhất định của QDs và khả năng phát hiện tác nhân gây bệnh dựa vào "cỗ máy phân tử" FOF1-ATPase.

Để kiểm tra hoạt tính của chromatophore chúng tôi thực hiện phản ứng Western blot sử dụng kháng thể kháng β -subunit - một trong 5 tiểu phần cấu tạo nên FOF1-ATPase được

sản xuất trong nghiên cứu trước [1]. Kết quả cho thấy, chromatophore tinh sạch phản ứng tốt với kháng thể kháng β -subunit (**hình 2**). Kết quả này cũng chỉ ra rằng chromatophore được tinh chế vẫn nguyên vẹn, đủ tiêu chuẩn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Tạo phức hợp chromatophore - chấm lượng tử

Chấm lượng tử CdTe được nghiên cứu và chế tạo tại Viện Khoa học vật liệu, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Vật liệu nano này có màu đỏ, kích thước khoảng 2-3 nm, hấp phụ ở bước sóng 610 nm. Để tạo phức hợp CdTe-chromatophore chúng tôi đã thay đổi một số điều kiện như tỷ lệ chromatophore/QDs, dung dịch đệm cũng như pH... để tìm ra điều kiện tối ưu (kết quả không trình bày ở đây). Qua khảo sát các điều kiện chúng tôi đã tìm ra điều kiện tối ưu sau: 100 μ l chromatophore tinh chế (nồng độ 0,4 mg/ml) được ủ với 40 μ l chấm lượng tử (2.5×10^{15} hạt/ μ l) trong đệm Tricine 50 mM, pH 6.5 chứa 5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl trong thời gian 3 giờ ở nhiệt độ 25°C. Sự hình thành phức hợp CdTe-chromatophore được kiểm tra dưới kính hiển vi huỳnh quang, phức hợp này sẽ phát quang màu đỏ.



Hình 3. Phức hợp chromatophore - chấm lượng tử dưới kính hiển vi huỳnh quang với độ phóng đại 40X (hình bên trái) và phức hợp đơn lẻ được khuếch đại (hình bên phải).

QDs bám lên bề mặt của chromatophore nhờ lực liên kết bền vững và không làm mất đi đặc tính phát quang của chúng. QDs có

kích thước nhỏ (<10 nm), có khả năng phát quang; chromatophore có kích thước khoảng 100nm và không có khả năng phát quang. Do

đó, khi chromatophore được bao phủ bởi các hạt QDs, phức hợp này có khả năng phát quang. Hình ảnh chụp trên kính hiển vi huỳnh quang (hình 3) cho thấy, mỗi điểm phát sáng có kích thước khoảng 300 nm, chúng là phức hợp chromatophore-QD CdTe được tạo thành. Các hạt QDs tự do không liên kết với chromatophore bị rửa trôi hầu như hoàn toàn khi rửa phức hợp nhiều lần bằng đệm PBS.

Ảnh chụp huỳnh quang cho thấy, các hạt QDs bám xung quanh chromatophore nhiều lớp, phân bố không đồng đều. Ở một vài vị trí xuất hiện các đám co cụm, phát quang mạnh. Điều này có thể giải thích như sau: càng nhiều hạt QDs bám trên bề mặt chromatophore thì sự phát quang càng mạnh, nhưng do sự bám kết xảy ra ngẫu nhiên nên một số chromatophore gắn kết với nhiều hạt QDs thể hiện bởi cường độ phát quang mạnh hơn so với chromatophore gắn kết với ít hạt QDs (hình 3). Ngoài ra còn một nguyên nhân có thể khác đó là do kích thước các hạt QDs sử dụng trong nghiên cứu không đồng đều.

Chúng tôi cũng khảo sát sơ bộ độ ổn định của phức hợp CdTe-chromatophore tạo ra sau thời gian bảo quản nhất định và nhận thấy, độ phát quang của phức hợp giảm dần theo thời gian. Ngay sau khi đánh dấu, phức hợp phát quang mạnh, nhưng sau 3-4 ngày, độ phát quang giảm đáng kể và hoặc không phát quang. Nguyên nhân của hiện tượng này chưa được hiểu rõ nhưng có khả năng là do chromatophore bị phân hủy trong quá trình bảo quản, hoặc do chất lượng hạt QDs không tốt, hoặc cũng có thể do liên kết giữa CdTe và chromatophore không đủ mạnh và dễ bị tách rời theo thời gian. Các yếu tố này sẽ được khảo sát kỹ hơn trong các nghiên cứu tiếp theo.

IV. KẾT LUẬN:

Chúng tôi đã tách chiết và tinh chế thành công chromatophore từ vi khuẩn tía *Rhodospirillum rubrum*. Qua các khảo sát đã tìm được điều kiện thích hợp cho việc tạo phức hợp chromatophore - chấm lượng tử. Đây là những kết quả bước đầu quan trọng tiến tới nghiên cứu và phát triển được biosensor để phát hiện siêu nhạy, nhanh và đặc hiệu các tác nhân gây bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH:

1. Nguyễn T.H., Đồng V.Q., Vũ T.H., Nguyễn T.T., Lê P.H., Nguyễn Q.L., Đinh D.K (2012) Biểu hiện, tinh sạch tiểu phần β -subunit của F₀F₁-ATPase và sản xuất kháng thể kháng β -subunit tái tổ hợp làm nguyên liệu cho việc phát triển biosensor dùng trong chẩn đoán bệnh. *Tạp chí Công nghệ sinh học* (đang in).
2. Ứng T.D.T., Phạm S.T., Nguyễn Q.L (2010) Influence of pH on the creation and growth of water-soluble CdTe quantum dots. *Journal of science and technology*. 48(3), p.127-133
3. Alivisatos, A. P., W. Gu, C. Larabell (2005) Quantum dots as cellular probes. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 7:55-76
4. Deng Z, Zhang Y, Yue J, Tang F, Wei Q. (2007) Green and orange CdTe quantum dots as effective pH-sensitive fluorescent probes for dual simultaneous and independent detection of viruses. *J Phys Chem B*. 111 (41):12024-12031.
5. Haiqing L, Orge J, Jacob S, George DB, Shanir SR, Loren LL, Homme WH, Montemagno CD (2002) Control of a biomolecular motorpowered nanodevice with an engineered chemical switch. *Nat Mater* 1: 173-177.
6. Liu Xiao Long, Zhang Yun, Yue Jia Chang, Jiang Pei Dong, Zhang Zhen Xi (2006) F₀F₁-ATPase as biosensor to detect single virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342, 1319-1322.
7. Montemagno C, Bachand GD (1999) Constructing nanomechanical devices powered by biomolecular motors. *Nanotechnology* 10: 225-231.