

# NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG LECTIN TRONG ĐỊNH LOẠI MỘT SỐ *BACILLUS*

Bùi Phương Thuận, Vũ Minh Đức, Nguyễn Văn Dũng

Khoa Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQG Hà Nội

Với bản chất là protein hoặc glycoprotein, không có nguồn gốc miễn dịch và không có hoạt tính enzym, lectin đã được nghiên cứu và sử dụng nhiều trong những năm gần đây để phát hiện và định loại các vi khuẩn gây bệnh [1]. Chúng có những ưu điểm như: có thể được sử dụng để gây ngưng kết tế bào, để cô đặc hay phát hiện các đột biến bề mặt tế bào vi khuẩn; vượt trội các kháng thể về khả năng phân biệt những sai khác rất nhỏ trong thành phần xacarit trên bề mặt tế bào cũng như khả năng xâm nhập vào các vị trí trên bề mặt vi khuẩn, không độc và rất bền ở dạng chế phẩm đông khô; có thể được sử dụng ở dạng dẫn xuất gắn với enzym, với vàng, với các đồng vị hoặc các chất chuẩn khác [1, 5]

Là những vi khuẩn Gram (-), đặc điểm quan trọng của *Bacillus* là tạo bào tử kết hợp với việc sinh ra các sản phẩm sinh học như độc tố diệt côn trùng, các kháng sinh polypeptit [3]. Đã có nhiều loài *Bacillus* được phân lập và định tên với nhiều hệ thống khác nhau. Đa số chúng sống trong đất, với số lượng quyết định độ phì của đất. Một số loài có khả năng cố định nitơ (*B. polymyxa*, *B. azotofixan*...) nên có quan hệ gần gũi và giúp thực vật phòng và chống các bệnh về nấm nhờ khả năng tiết ra các chất kháng sinh chống nấm. Một số loài khác (*B. anthracis*, *B. cereus*...) lại có khả năng xâm nhập, lây nhiễm cho người và động vật, gây những bệnh như nhiễm trùng, viêm màng não [3, 5, 6]... Việc nghiên cứu sử dụng lectin từ nguồn sinh vật tại Việt nam để định dạng *Bacillus* sẽ tạo điều kiện cho những nghiên cứu tiếp theo hướng này.

# I. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

## 1. Nguyên liệu

- Lectin thô: Các mẫu hạt, lá hoa... được làm sạch, phơi sấy khô, nghiền thành bột mịn. Lectin thô từ mẫu thí nghiệm được chiết rút bằng nước cất, dung dịch muối sinh lý, đệm PBS hoặc đệm Tris-HCl.

- Huyết thanh sam được thu từ loài *Tachypleus tridentatus* đánh bắt ở vùng biển Sầm sơn, Thanh hoá.

- Hồng cầu và huyết thanh người bình thường được lấy từ Trung tâm huyết học và Truyền máu Trung ương.

- Các chủng *Bacillus*, *E. coli* do Bộ môn Vi sinh Trường Đại học Khoa học Tự nhiên cung cấp, được cấy truyền và nuôi cấy trong môi trường lỏng LB qua đêm ở 30° C, sau đó ly tâm để thu tế bào ở 8000 vòng/phút. Tế bào được rửa sạch bằng đệm PBs (pH 7,4) và được chia làm hai phần, một phần để nguyên còn phần kia được xử lý ở 100°C trong 15 phút. Cả hai loại tế bào sau đó được hòa lại trong đệm PBs và điều chỉnh đến độ đục thích hợp ở bước sóng 600 nm trên máy đo quang phổ.

- Các hoá chất cần thiết cho nghiên cứu đều đạt mức tinh khiết phân tích.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

1) Xác định hoạt độ lectin bằng phản ứng gây ngưng kết hồng cầu [4]

Hoạt độ lectin hay hoạt độ gây ngưng kết hồng cầu (Haemagglutinating Activity\_HAA) được tính là giá trị nghịch đảo của độ pha loãng lớn nhất của dịch lectin còn có khả năng làm ngưng kết hoàn toàn lượng hồng cầu cho vào.

*Cách tiến hành:* Cho vào mỗi giếng của bản nhựa (microtiter system) 50 µl đệm, sau đó cho 50 µl dịch mẫu vào giếng đầu tiên, trộn đều và pha loãng sang các giếng tiếp theo với tỉ lệ pha 1/2<sup>n</sup> (n: là số giếng) sau đó cho vào mỗi giếng 50µl hồng cầu 2%. Để bản nhựa 30-60 phút ở nhiệt độ phòng trước khi đọc kết quả.

## 2) Phản ứng gây ngưng kết các tế bào vi sinh vật [1]

Chuẩn bị các dung dịch lectin gốc từ đó pha ra các nồng độ thích hợp. Trộn 50 $\mu$ l dịch tế bào với 50  $\mu$ l dung dịch lectin trên các giếng của bản thử Boerner, song song với các giếng đối chứng (không có lectin và kết quả không có ngưng kết) cho lên máy lắc nhẹ, sau thời gian 15 phút, đọc kết quả ngưng kết trên hộp gương. Kết quả là dương tính nếu xuất hiện các khối kết tụ của tế bào vi khuẩn thành từng mảng lớn hoặc nhỏ, hoặc gây phân giải tế bào, tùy thuộc vào hoạt độ của lectin. Nồng độ lectin cũng được lựa chọn để đạt tác dụng cao nhất, phát hiện loại vi khuẩn đặc hiệu. Thí nghiệm được tiến hành song song với các tế bào vi khuẩn được xử lý ở 100 $^{\circ}$ C để phá huỷ bề mặt tế bào, làm lộ các vị trí liên kết lectin, tạo điều kiện thuận lợi hoặc gây ra các phản ứng ngưng kết.

Các số liệu được xử lý theo phương pháp so sánh hai giá trị trung bình bằng thống kê sinh học dựa trên chương trình Excel 5.0.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1) Khả năng ngưng kết các loại hồng cầu của lectin

Khả năng gây ngưng kết tế bào hồng cầu của động vật là một tính chất quan trọng, điển hình của lectin. Trong nhiều trường hợp có thể dựa vào đó để phát hiện lectin ở các đối tượng nghiên cứu. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu khả năng gây ngưng kết hồng cầu người (các nhóm máu A, B, O) của các dịch chiết mẫu thực vật, cũng như của huyết thanh sam. Kết quả cho thấy sự khác nhau giữa các mẫu. Những mẫu có hoạt độ gây ngưng kết hồng cầu cao là mít, hồng xiêm, xoài, bưởi, sắn, đậu đỏ..., trung bình là: vải, bơ, dưa hấu..., thấp là: trám, đỗ xanh, đỗ đen...

Dựa vào những kết quả này, chúng tôi lựa chọn những mẫu thích hợp (thường là những mẫu có hoạt độ cao) cho các thí nghiệm tiếp theo. Chúng được coi là dịch chiết lectin thô.

### 2) Nghiên cứu khả năng gây ngưng kết tế bào vi sinh vật của lectin

Khả năng gây ngưng kết tế bào vi sinh vật của các loại dịch chiết lectin thô kể trên đã được nghiên cứu. Đặc biệt, một số chế phẩm lectin

tinh khiết với tính đặc hiệu xác định (bị một hoặc một số loại đường đơn hay đường phức hợp gây ức chế hoạt độ) đã được sử dụng. Có thể so sánh tác dụng của chúng với các dịch chiết thô và dự đoán, phát hiện các phức hợp đường trên bề mặt tế bào. Căn cứ vào đó có thể định loại các vi sinh vật. Các kết quả được trình bày trên bảng 1.

Qua bảng 1 có thể thấy khả năng gây ngưng kết tế bào các chủng *Bacillus* của các chế phẩm lectin tinh chế (các mẫu số 1, 2, 3) là khá cao. Trong số các dịch chiết lectin thô, sam, khoai tây, bơ, búa, lạc, dưa hấu có hoạt độ gây ngưng kết rất cao, đặc biệt đối với các chủng vi khuẩn BST1 và 2. Các mẫu mít, nhân tuy đã sử dụng ở nồng độ protein rất cao, nhưng tác dụng gây ngưng kết còn rất thấp. Điều đó chứng tỏ sự đặc hiệu với các phức hợp đường khác nhau trên bề mặt tế bào *Bacillus* của các lectin khác nhau. Quá trình xử lý nhiệt đối với các tế bào vi khuẩn đã có tác dụng làm tăng phản ứng ngưng kết của chúng dưới tác dụng của lectin. Các chủng BST1, 11, 12, 13, 14, 17, 18 bị lectin số 1 là ConA gây ngưng kết ở hầu hết các mẫu tế bào nguyên hoặc đã xử lý nhiệt. Do ConA đặc hiệu với đường manose và glucose, có thể dự đoán ở trên bề mặt tế bào của các loại vi khuẩn này có các polyxacarit chứa hai loại đường kể trên. Tương tự như vậy, ta có thể dự đoán về trường hợp của các chủng BST1, 2, 8, 10, 11, 12, 15, 16, 17 bị lectin HPA (đặc hiệu với  $\alpha$ -N-acetylgalactosamin) và BST1, 2, 15, 17 bị lectin SBA (đặc hiệu với  $\alpha$ - và  $\beta$ -N-acetylgalactosamin) gây ngưng kết.

Có thể nhận thấy không phải tất cả các loại chủng *Bacillus* đều có một kiểu ngưng kết giống nhau. Thí dụ như ConA gây ngưng kết ở một số chủng này nhưng không tác dụng lên các loại khác. Tương tự như vậy, một số lectin tuy có đường đặc hiệu giống nhau, nhưng lại khác biệt trong khả năng gây ngưng kết, như trường hợp của ConA và SBA. Điều này cho thấy sự không đồng nhất về thụ thể (trung tâm tương tác với lectin - các xacarit) trên bề mặt tế bào các chủng *Bacillus* khác nhau. Độ sai khác này còn có thể phụ thuộc vào thành phần và kiểu liên kết của chúng với phần xacarit và polypeptit còn lại của phân tử. Chính vì lý do này mà lectin mới có thể trở thành công cụ đặc lực trong nghiên cứu bệnh dịch học [1, 5].

**Bảng 1: Sự ngưng kết của vi khuẩn Bacillus do tác dụng của lectin**

| TT | Tên mẫu   | BST 1      | BST 2      | BST 3      | BST 4      | BST 5      | BST 6      | BST 7 | BST 8      | BST 9      | BST 10    | BST 11     | BST 12     | BST 13     | BST 14     | BST 15 | BST 16 | BST 17     | BST 18     | BST 19 | BST 20 | Số chủng ngưng kết (%) |            |
|----|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|--------|--------|------------|------------|--------|--------|------------------------|------------|
| 1  | ConA      | 4+<br>(4+) | -          | -          | -          | -          | -          | -     | 2+<br>(2+) | -          | 2+<br>(+) | +          | 4+<br>(2+) | 2+<br>(2+) | 3+<br>(4+) | -      | -      | +          | +          | -      | -      | -                      | 45<br>(45) |
| 2  | HPA       | 4+<br>(3+) | (+)        | -          | -          | -          | -          | -     | 2+<br>(2+) | -          | 2+        | +          | 4+<br>(2+) | 4+<br>(2+) | -          | +      | +      | +          | -          | -      | -      | -                      | 40<br>(20) |
| 3  | SBA       | (+)        | (+)        | -          | -          | -          | -          | -     | -          | -          | -         | -          | -          | -          | -          | +      | -      | +          | -          | -      | -      | -                      | 10<br>(10) |
| 4  | Khoai tây | (+)        | (+)        | 4+<br>(4+) | 4+<br>(4+) | 3+<br>(2+) | (2+)       | (3+)  | 4+         | (4+)       | 2+        | -          | 4+<br>(4+) | -          | -          | -      | -      | 3+<br>(3+) | 3+<br>(3+) | -      | -      | -                      | 45<br>(45) |
| 5  | Hồng      | +          | 2+         | -          | -          | -          | +          | +     | -          | +          | +         | -          | 2+<br>(2+) | -          | -          | -      | -      | -          | -          | -      | -      | -                      | 45<br>(15) |
| 6  | Mít dai   | -          | (+)        | -          | -          | -          | -          | +     | +          | -          | -         | -          | -          | 2+         | 2+         | -      | -      | +          | +          | +      | +      | 40<br>(5)              |            |
| 7  | Vải       | -          | +          | +          | +          | +          | -          | -     | +          | -          | -         | -          | -          | (4+)       | (2+)       | -      | -      | +          | -          | -      | -      | -                      | 30<br>(15) |
| 8  | Hoa hoè   | -          | 3+         | 3+         | 2+         | 3+         | (4+)       | -     | -          | -          | -         | 2+         | -          | -          | -          | -      | -      | -          | -          | -      | -      | -                      | 25<br>(5)  |
| 9  | Xoài      | +          | 2+         | -          | -          | -          | -          | -     | -          | -          | -         | -          | -          | -          | -          | -      | -      | -          | -          | -      | +      | -                      | 20<br>(0)  |
| 10 | Đỗ tương  | -          | (+)        | -          | -          | -          | -          | -     | -          | -          | -         | -          | -          | -          | -          | -      | -      | 3+<br>(2+) | 2+<br>(2+) | 2+     | 2+     | 25<br>(15)             |            |
| 11 | Đậu đỏ    | +          | 2+         | -          | -          | -          | -          | -     | -          | -          | -         | -          | -          | -          | +          | 4+     | 4+     | 3+<br>(2+) | 2+         | 4+     | 2+     | 45<br>(0)              |            |
| 12 | Bơ        | 2+<br>(3+) | (2+)       | -          | (3+)       | (4+)       | -          | (2+)  | 2+<br>(3+) | (4+)       | 2+        | 2+<br>(3+) | 3+         | -          | -          | -      | -      | -          | -          | -      | -      | -                      | 25<br>(40) |
| 13 | Bưởi      | 3+<br>(4+) | 3+<br>(4+) | (4+)       | 3+<br>(4+) | 4+<br>(4+) | (4+)       | (2+)  | 4+<br>(4+) | 2+<br>(3+) | 3+        | -          | 2+         | -          | -          | +      | 3+     | -          | -          | -      | -      | -                      | 50<br>(45) |
| 14 | Nhãn      | +          | 2+         | -          | (2+)       | 3+<br>(+)  | -          | -     | 2+         | -          | +         | -          | -          | 3+         | -          | -      | -      | -          | -          | -      | -      | -                      | 30<br>(10) |
| 15 | Dưa hấu   | +          | 2+         | +          | +          | +          | -          | -     | -          | -          | -         | +          | (+)        | -          | -          | 2+     | 2+     | -          | -          | -      | -      | -                      | 40<br>(20) |
| 16 | Đậu lăng  | +          | 2+         | -          | (2+)       | (+)        | -          | -     | -          | -          | -         | -          | (2+)       | +          | -          | -      | -      | -          | -          | -      | -      | -                      | 25<br>(5)  |
| 17 | Đậu biến  | kxd        | kxd        | kxd        | kxd        | kxd        | -          | -     | +          | -          | -         | -          | -          | -          | -          | -      | -      | -          | -          | -      | -      | -                      | 7<br>(0)   |
| 18 | Sam biển  | 3+<br>(2+) | 4+         | (2+)       | 2+<br>(2+) | 4+<br>(4+) | 2+<br>(2+) | +     | (2+)       | +          | (2+)      | (+)        | +          | 4+<br>(4+) | -          | 2+     | -      | -          | -          | -      | 2+     | -                      | 60<br>(60) |
| 19 | Mướp      | kxd        | kxd        | kxd        | kxd        | kxd        | -          | -     | -          | (2+)       | -         | -          | -          | 3+         | 4+         | 2+     | 2+     | +          | +          | +      | +      | +                      | 53<br>(13) |
| 20 | Trám      | kxd        | kxd        | kxd        | kxd        | kxd        | -          | -     | -          | +          | 2+        | 2+         | 2+         | -          | -          | 2+     | +      | +          | +          | -      | -      | -                      | 47<br>(0)  |

Ghi chú: +, 2+, 3+, 4+ chỉ mức độ ngưng kết

-: không gây ngưng kết

kxd: không xác định

( ): số liệu của các mẫu vi khuẩn đã xử lý ở 100°C trong 5 phút

Chúng tôi dự đoán các chủng vi khuẩn BST1 và BST12, BST4 và BST5, BST8 và BST10, BST13 và BST14, BST17 và BST 18 giống nhau theo từng cặp một, do sự ngưng kết với các lectin của chúng rất giống nhau. Ngoài ra, các chủng số 10, 11 và 8,9 hoặc 6, 7 cũng có phản ứng ngưng kết khá giống nhau.

Như vậy, có thể dựa vào cấu trúc hoá học của các loại đường có trên bề mặt tế bào vi khuẩn, dựa vào sự ngưng kết với các lectin đặc hiệu với các loại đường khác nhau để định loại vi khuẩn một cách chính xác và nhanh chóng.

### III. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

#### Kết luận:

1. Hoạt độ ngưng kết của các lectin ở các mẫu nghiên cứu khác nhau là khác nhau.

2. Quá trình xử lý nhiệt với các tế bào *Bacillus* đã có tác dụng làm tăng phản ứng ngưng kết của chúng đối với lectin ở hầu hết các trường hợp.

3. Các thụ thể (trung tâm tương tác với lectin - các xacarit) trên bề mặt tế bào của các chủng *Bacillus* khác nhau là không đồng nhất, với mức độ sai khác phụ thuộc vào thành phần và kiểu liên kết của chúng với phần xacarit và polypeptit còn lại của phân tử.

#### Đề nghị:

Việc ứng dụng lectin để định loại vi khuẩn là một phương pháp tương đối mới, nhưng dễ thực hiện, không phức tạp, cần thiết và có ý nghĩa quan trọng trong y học chẩn đoán và lâm sàng, cũng như trong các nghiên cứu về sinh học, nông học. Vì vậy cần mở rộng nghiên cứu hơn nữa để lectin trở thành công cụ đắc lực phục vụ cho các nghiên cứu và áp dụng trong thực tiễn của các lĩnh vực trên.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Doyle R.J. (1994). - Introduction to lectin and their interaction with microorganisms. In: Lectin- microorganism interactions. Ed. by Doyle R. J and Slifkin M. M. Publ. Marcel Dekker, Ink. New York, 1-65.
2. Etzler M. E. (1986). - Distribution and function of plant lectins. In: The lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine. Ed. by Liener I. E., Sharon N. and Goldstein I. J. Academic Press. Orlando, 371- 435.
3. Gibson T. and Gordon R. E. (1974). - Genus *Bacillus*. In : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8<sup>th</sup>. Ed. by Gidson E. N. *et al*. Publ. Williams and Wilkins, Baltimore, 542- 543.
4. Roche A. C. and Monsigny (1974). M. - Purification and properties of limulin: a lectin (agglutinin) from haemolymph of *Limulus polyphemus*. Biochem. Biophys. Acta 371, 242- 254.
5. Slifkin M. (1994).- Application of lectin in clinical bacteriology. In: Lectin- microorganism interactions. Ed. by Doyle R. J and Slifkin M. M. Publ. Marcel Dekker, Ink. New York, 143- 172.
6. Yamanodo T. (1983)- Identification of entomocidal toxin of *Bacillus thuringiensis* by high performance liquid chromatography. J. Microbiol. 129, 2595- 2603.