PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH CỦA VI KHUẨN SINH TỔNG HỢP ENZYME URICASE

Phạm Thanh Hà*, Trần Đình Mấn, Trần Thị Hoa

Viện Công nghệ sinh học, *ptha04@yahoo.com

TÓM TẮT: Vi khuẩn sinh tổng hợp uricase được phân lập từ đất trên môi trường thạch đĩa chứa axit uric. Các chủng vi khuẩn được đánh giá hoạt tính dựa trên sự tạo vòng phân giải trên bề mặt thạch. Chủng vi khuẩn CN3 có khả năng tạo vòng phân giải axit uric tối đa trong thời gian ngắn được tuyển chọn. Dựa trên các đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hóa và trình tự gen 16S rRNA, chủng CN3 được xác định là *Pseudomonas putida*. Chủng *P. putida* CN3 được tìm thấy vừa có khả năng sinh tổng hợp uricase nội bào lại vừa có khả năng sinh uricase ngoại bào. Trên môi trường nuôi cấy dịch thể chứa 0,5% axit uric, *P. putida* CN3 sinh tổng hợp enzyme uricase với hoạt tính ngoại bào ~ 0,85 U/ml và nội bào ~ 0,45 U/ml.

Từ khóa: Pseudomonas, axit uric, phân lập, uricase, vi khuẩn.

MỞ ĐẦU

Uricase (tên mới là urate oxidase) là một enzyme khu trú trong peroxisome, tham gia vào con đường phân hủy purine, xúc tác cho sự oxyhóa mở vòng purine của axit uric khó tan thành allantoin dễ dàng để bài tiết [7]. Uricase được ứng dụng chủ yếu cho hóa sinh lâm sàng như một chỉ thị chẩn đoán để xác định hàm lượng axit uric trong máu và nước tiểu. Ngoài ra, nó còn được dùng như thuốc để ngăn ngừa và điều trị bệnh gout, hội chứng li giải khối u và một số bệnh rối loạn tăng cao axit uric máu. Hiện nay, nhiều vi sinh vật mới đã được tìm thấy có khả năng sản sinh uricase với tính chất tốt và năng suất cao. Mặc dù uricase có nguồn gốc vi sinh vật được nghiên cứu nhiều, nhưng chỉ ít loại được phát triển thành sản phẩm thương mại [6, 10].

Việc nghiên cứu sản xuất uricase giúp phòng và điều trị các bệnh tăng axit uric máu ở Việt nam vẫn còn là vấn đề mới. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập một số chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp enzyme uricase, chọn lọc một chủng tốt nhất và xác định hoạt tính sinh tổng hợp uricase nội và ngoại bào của chúng này trên môi trường dịch thể có bổ sung cơ chất cảm ứng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vi sinh vật và nuôi cấy

Các chủng vi khuẩn có hoạt tính sinh tổng hợp enzyme uricase được phân lập từ một số mẫu đất thu thập tại một số địa điểm thuộc Hà Nội.

Môi trường phân lập và giữ giống (A) có thành phần (g/L): glucose 1, cao nấm men 1, axit uric 5, agar 20 theo Lehej Čková et al. (1986) [5]. Môi trường nuôi cấy dịch thể (B) chứa (g/L): pepton 5, glucose 10, K_2HPO_4 1, $MgSO_4.7H_2O$ 0,5; NaCl 0,5; axit uric 5; pH 7 theo Azab et al. (2005) [2].

Nuôi cấy xác định hoạt tính enzyme: 1% giống từ nuôi cấy dịch thể 24h được chuyển vào bình tam giác 500 ml chứa 100 ml môi trường (B). Nuôi trên máy lắc 200 rpm/30^{o}C/48 h. Cuối giai đoạn nuôi cấy đo hoạt độ uricase nội và ngoại bào.

Phân lập vi khuẩn

Cấy gạt dịch huyền phù đất lên đĩa pettri chứa môi trường thạch (A). Nuôi những đĩa cấy ở 30^{o}C. Sau 3-5 ngày quan sát khả năng phân giải axit uric của các khuẩn lạc trên bề mặt đĩa thạch. Sự tạo vòng trong của môi trường quanh khuẩn lạc xác định hoạt tính uricase.

Định tính khả năng phân giải axit uric của vi khuẩn

Các chủng sau khi phân lập được cấy chấm điểm lên môi trường thạch đĩa (A). Nuôi những đĩa cấy ở 30^{o}C. Sau 3, 6, 9, 12 ngày, quan sát hình thái, màu sắc khuẩn lạc và đo đường kính của vòng phân giải axit uric quanh khuẩn lạc. Đánh giá hoạt tính của các chủng dựa vào độ lớn cực đại của vòng phân giải.

Chủng VK có khả năng phân giải axit uric

tốt nhất trên môi trường thạch đĩa được chọn lọc và nuôi lắc trong bình tam giác chứa môi trường dịch thể (B). Cuối giai đoạn nuôi cấy, 50 l dịch nuôi đã loại tế bào được nhỏ vào các lỗ thạch chứa 0,5% axit uric, không chứa môi trường dinh dưỡng. Môi trường dịch thể vô trùng được dùng như đối chứng. Đĩa được ủ ở 30^{o}C trong 24 giờ. Sự tạo vòng phân giải axit uric quanh lỗ trên thạch đĩa chứng minh sự có mặt của uricase ngoại bào trong dịch nuôi cấy.

Phân loại vi khuẩn

Đặc điểm hình thái học khuẩn lạc vi khuẩn, hình thái học tế bào, khả năng bắt màu Gram, tạo bào tử, khả năng hiếu khí, hoạt tính catalase, khả năng di động, khả năng lên men theo Nguyễn Lân Dũng và nnk. (1972) [**3**].

Các đặc điểm sinh hóa được xác định bằng kít chuẩn API 20NE (bioMerieux, Pháp) và phân tích bằng phần mềm APILAB PLUS 3.3.3.

Phân loại vi khuẩn bằng sinh học phân tử dựa trên trình tự 16S rRNA: tách DNA tổng số. Gen 16S được tổng hợp dùng cặp mồi P1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' và P2:5'-ACGGTTACCTTGTTACCGACTT- 3'. Sản phẩm PCR sau tinh sạch được xác định trình tự trên máy đọc tự động Applied Biosystems 373A. Phân tích phả hệ để xác định mối quan hệ di truyền với các chủng vi khuẩn khác theo Sambrook & Russell (2000) [**9**].

Xác định hoạt tính enzyme

Thu enzyme thô: sau khi nuôi cấy kết thúc, li tâm (12.000 vòng/15 phút/4^{o}C) tách riêng tế bào và dịch nuôi. (1) Thu enzyme nội bào: tế bào được đồng nhất trong 1,2 ml đệm botate và xung điện 10 x, mỗi lần 10s, giữa các đợt làm lạnh trong nước đá 30s. Sau đó li tâm (10.000 vòng/30 phút ở 4^{o}C) loại xác tế bào, pha trên được thu như enzyme nội bào thô; (2) Thu enzyme ngoại bào: dịch nuôi đã loại tế bào được thu như enzyme ngoại bào thô.

Phân tích hoạt tính enzyme: Sự sản sinh enzyme của vi khuẩn được đo bằng kit phân tích uricase (Invitrogen, Mỹ). Trong phân tích, uricase xúc tác cho việc chuyển axit uric thành allantoin, H_2O_2 và CO_2. Sau đó H_2O_2 trong sự có mặt của horseradish poroxidase (HRP), phản ứng với chỉ thị màu Amplex Red để tạo sản phẩm oxyhoá huỳnh quang đỏ. Phản ứng được thực hiện trên đĩa ELISA 30 phút/37^{o}C (tránh ánh sáng). Đo độ hấp phụ tối ưu trên máy đọc đĩa ELISA (BioTek, Mỹ) ở bước sóng 560 nm. Tính toán nồng độ uricase trong mẫu dựa trên đường chuẩn uricase.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn tích luỹ enzyme uricase cao

Từ 18 mẫu đất đã phân lập được 50 chủng vi khuẩn có hoạt tính sinh uricase tương đối cao (đường kính vòng phân giải axit uric > 2,5 cm). Các vi khuẩn phân lập được cấy chấm điểm lên môi trường thạch đĩa chứa 5 g/L axit uric. Việc sản sinh uricase được xác định bởi sự tạo vòng phân giải axit uric. Sau 12 ngày nuôi cấy, quan sát thấy có 6 chủng CN3; RC1; SH3; ĐV1; ĐH1 và ĐB4 tạo vòng phân giải axit uric rất cao (phân giải hết axit uric trong môi trường thạch đĩa). Ảnh khuẩn lạc của một số chủng vi khuẩn tạo vòng phân giải axit uric trên môi trường thạch đĩa sau 12 ngày nuôi cấy được trình bày ở hình 1.

Trong số các chủng vi khuẩn có hoạt tính sinh uricase cao, chủng CN3 có khả năng phân giải hết axit uric trên môi trường thạch đĩa trong thời gian ngắn (5 ngày) được chúng tôi lựa chọn cho những nghiên cứu tiếp theo.

Phân loại chủng được tuyển chọn

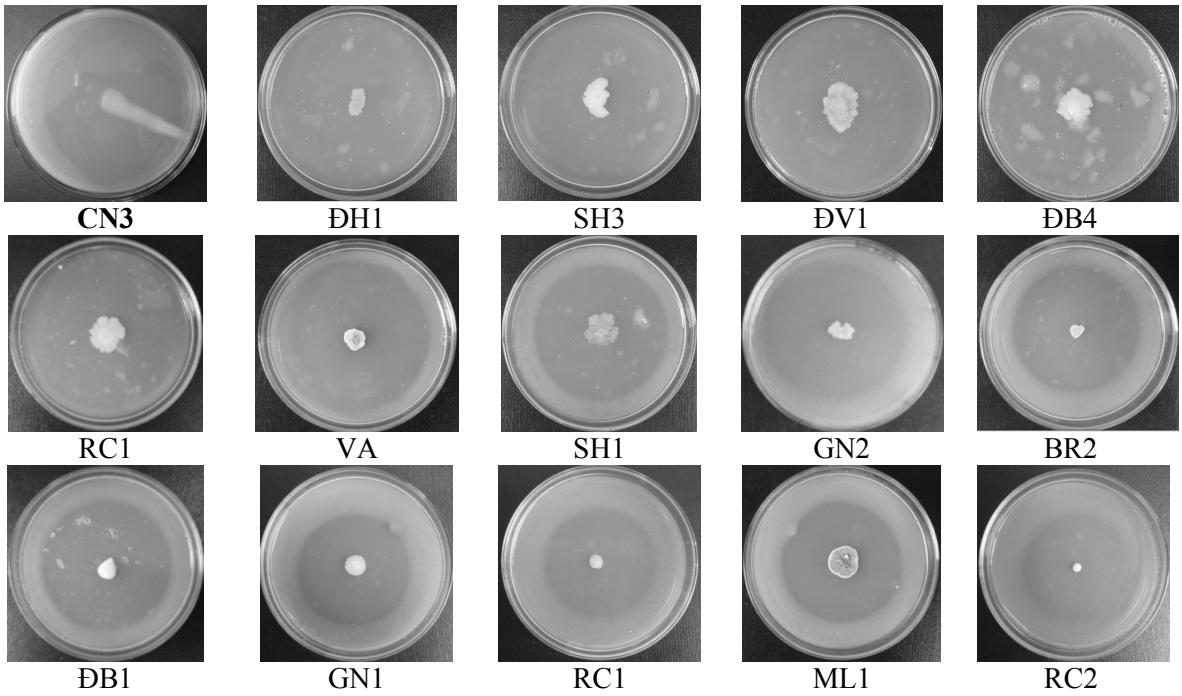
Dựa trên các đặc điểm hình thái

Kết quả quan sát đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên thạch đĩa, hình thái tế bào vi khuẩn dưới kính hiển vi điện tử, khả năng bắt màu Gram, khả năng hình thành bào tử và một số đặc điểm sinh lí, sinh học được trình bày ở bảng 1.

Theo các đặc điểm hình thái, sinh lí chủng CN3 có nhiều đặc điểm giống với vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* [4].

Phân loại vi khuẩn theo kit chuẩn sinh hoá API 20NE

Chủng CN3 thuộc loại trực khuẩn Gram (-) và có nhiều đặc điểm giống vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* nên được phân loại theo kit API 20NE. Trong quá trình kiểm tra, các phản ứng được nhận biết bằng sự đổi màu hoá chất. Kết quả được trình bày ở bảng 2.



Hình 1. Ảnh một số chủng vi khuẩn có hoạt tính uricase sau 12 ngày nuôi cấy

Bảng 1. Một số đặc điểm sinh học của chủng CN3

STT	Đặc điểm sinh học	Kết quả
1	Hình thái khuẩn lạc trên MPA	Khuẩn lạc phẳng màu kem đục, bề mặt bóng, tiết sắc tố huỳnh quang
2	Hình thái tế bào dưới kính hiển vi điện tử	Hình que, có 1 hoặc nhiều tiên mao, tế bào đứng riêng rẽ kích thước 0,7-1,1 x 2-4 µm
3	Khả năng bắt màu Gram	-
4	Khả năng hình thành bào tử	-
5	Hiếu khí	+
6	Vi hiếu khí	-
7	Khả năng di động	+
8	Phép thử catalaza	+
9	Khả năng oxyhoá	+
10	Khả năng lên men	+
11	Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng	25 - 30^{o}C
12	pH cho sinh trưởng	4 - 8
13	Chịu NaCl	1 - 5%

Bảng 2. Các phép thử sinh lí, sinh hóa theo kit API 20 NE của chủng CN3

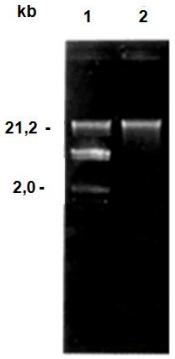
NO_3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	IGLUI	IARAI
+	-	+	+	+	+	-	+	+	+

IMNEI	IMANI	INAGI	IMALI	IGNTI	ICAPI	IADII	IMLTI	ICITI	IPACI	OX
-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+

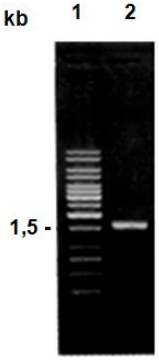
Đối chiếu với dữ liệu phần mềm cho thấy chủng CN3 tương đồng với vi khuẩn *Pseudomonas putida* (% id) ≥ 95% (xác định tốt). Kết hợp với khóa phân loại vi khuẩn của Bergey (1994) [4] có thể sơ bộ định tên chủng CN3 là *P. putida*. Để khẳng định thêm về vị trí phân loại của chủng này, chúng tôi tiếp tục tiến hành xác định trình tự gen 16S rARN.

Phân loại dựa trên trình tự gene 16S rARN

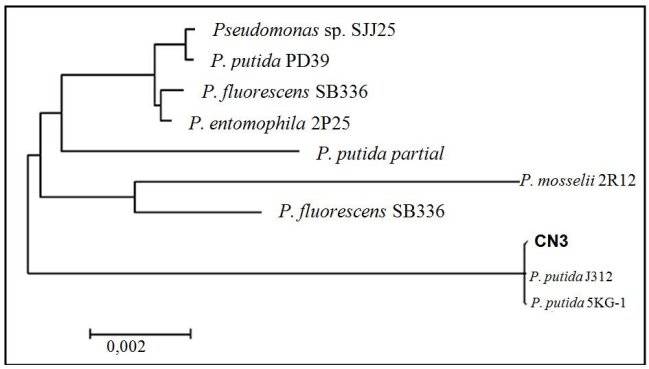
ADN tổng số từ chủng CN3 đã được chiết rút (hình 3). Từ khuôn ADN tổng số, bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi, chúng tôi đã thu được gen mã hoá 16S rARN của chủng CN3. Kết quả điện di đồ trên hình 4 cho thấy sản phẩm PCR thu được 1 băng rất đặc hiệu. Kích thước phân tử vào khoảng ~ 1,5 kb tương đương với tính toán lí thuyết. Sản phẩm PCR sau tinh sạch được dùng trực tiếp để xác định trình tự nucleotit của gen 16S rARN.



Hình 3. ADN tổng số



Hình 4. Sản phẩm PCR



Hình 5. Mối quan hệ di truyền của chủng CN3 qua phân tích gene 16S rARN

Phân tích trên máy xác định trình tự ADN tự động, xử lí bằng chương trình PC/GENE. Truy cập ngân hàng gen để tìm những loài đã đăng ký có trình tự tương đồng.

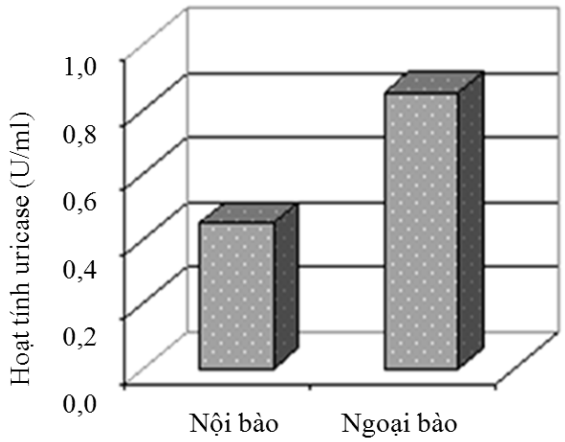
Trình tự của đoạn gen 16S rARN của chủng CN3 so sánh với chủng có mức độ tương đồng cao nhất trong ngân hàng gen. Kết quả cho thấy, chủng CN3 thể hiện mức độ sai khác về nucleotit của đoạn gen 16S rARN rất ít, chỉ sai khác ở 1 vị trí. Mức độ tương đồng với *P. putida* J312 rất cao tới 99%. Để biết mối quan hệ di truyền giữa các chủng được phân tích, cây phả hệ (hình 5) dựa trên phân tích phân đoạn gen 16S rARN đã được thiết lập. Cây phả hệ cho thấy, chủng CN3 phân lập tại Việt Nam cùng nhóm phụ với *P. putida* J312.

Căn cứ vào các đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hoá, kít chuẩn API 20NE, trình tự gen 16S rARN kết hợp với hệ thống phân loại vi khuẩn của Bergey chủng CN3 được phân loại là *P. putida*. Trình tự gen 16S của chủng *P. putida* CN3 đã được chúng tôi đăng kí trên GenBank với mã số GU967502. Hoạt tính uricase chưa được tác giả nào công bố tìm thấy ở *P. putida*. Vì vậy, có thể đây là một phát hiện mới. *P. putida* là một vi khuẩn không gây bệnh cho người cũng như động thực vật, do đó chủng *P. putida* CN3 có thể sử dụng cho những nghiên cứu sản xuất enzyme uricase làm nguyên liệu sản xuất thuốc phòng và điều trị các bệnh tăng axit uric trong máu.

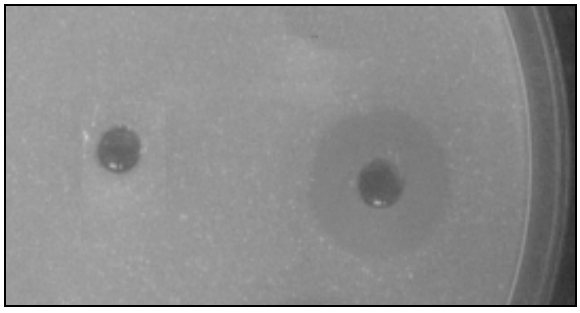
Nghiên cứu cách thức sản sinh uricase của *P. putida* CN3

Một số vi sinh vật như *Microbacterium*

ZZJ4-1 và *Streptomyces cyanogenus* sinh uricase nội bào và cần phá vỡ tế bào để thu enzyme [11]. Còn một số vi sinh vật như *Bacillus fastidious*, *Mucor hiemalis* và *Pseudomonas aeruginosa* lại sinh uricase ngoại bào [2, 8]. Phần lớn các chủng vi sinh vật tự nhiên tích luỹ uricase nội bào, tuy nhiên cũng có một số ít vi sinh vật được thông báo vừa có khả năng tích luỹ uricase nội bào lại vừa có khả năng sinh tổng hợp uricase ngoại bào [6].



Hình 6. Hoạt tính sinh tổng hợp uricase nội và ngoại bào của chủng *P. putida* CN3



Hình 7. Kiểm tra khả năng sinh uricase ngoại bào của CN3

P. putida CN3 sau khi nuôi cấy trên môi trường dịch thể được li tâm tách sinh khối. Hoạt tính uricase đã được đo trong cả hai dịch nổi và sinh khối. Kết quả (hình 6) cho thấy, uricase thô được tìm thấy trong cả dịch nổi đã loại sinh khối (~ 0,85 U/ml) và trong sinh khối (~ 0,45 U/ml). Trên thạch đĩa không dinh dưỡng chứa 0,5% axit uric (hình 7) uricase ngoại bào chuyển axit uric không tan thành allantoin hoà tan trong nước thể hiện bằng vòng trong (đường kính vòng phân giải ~ 1,8 ± 0,08 cm). Dịch môi trường vô trùng không có uricase không thấy tạo vòng phân giải. Như vậy, *P. putida* CN3 là vi khuẩn vừa có khả năng tích luỹ uricase nội bào, lại vừa có khả năng tiết uricase ngoại bào.

Đa số vi sinh vật thường tích lũy uricase bên trong tế bào, vì thế, việc tách enzyme thường qua các bước nghiền, phá vỡ tế bào. Do đó, việc sản xuất uricase bởi những vi sinh vật này dựa trên qui trình 3 bước, gồm một bước nuôi tế bào, một bước cảm ứng sản xuất enzyme trong sự có mặt của axit uric sau khi thu tế bào nuôi cấy và một bước tách uricase sinh ra trong tế bào. Theo qui trình 3 bước, việc tách và tinh sạch uricase được xem là phức tạp với nhiều loại protein và enzyme khác nhau lẫn trong đó với lượng lớn làm cho việc sản xuất cho hiệu quả thấp [1].

Chủng *P. putida* CN3 có ưu điểm có khả năng sản sinh uricase ngoại bào vì vậy enzyme uricase từ chủng này có thể được tinh sạch trực tiếp từ dịch nuôi không cần qua bước phá vỡ tế bào phức tạp lại cho enzyme có hoạt tính và độ tinh sạch cao hơn so với enzyme nội bào. Vì vậy, tiếp theo chúng tôi sẽ tập trung nghiên cứu về hoạt tính sinh enzyme uricase ngoại bào từ chủng vi khuẩn này.

KẾT LUẬN

Trong số 50 chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp uricase phân lập từ 18 mẫu đất, chủng *Pseudomonas putida* CN3 có khả năng sản sinh mức độ cao enzyme trong thời gian ngắn đã được chọn lọc. Trên môi trường dinh dưỡng dịch thể chứa 0,5% chất cảm ứng axit uric, chủng *P. putida* CN3 sinh tổng hợp uricase nội bào với hoạt tính ~ 0,45 U/ml và uricase ngoại bào với hoạt tính ~ 0,85 U/ml.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài cấp Viện Khoa học và Công nghệ Việt nam 2010 -2011.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Adamek V., Kralova B., Suchova M., Valentova O., Demnerova K., 1989. Purification of microbial uricase. J. Chromatography, 497: 268-275.
2. Azab E. A., Ali M. M., Fareed M. F., 2005.

Studies on uricase induction in certain bacteria. Egyptian J. Biol. 7: 44-54.

3. Nguyễn Lân Dũng, Đoàn Xuân Mượu, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Trạch, Phạm Văn Ty, 1972. Một số phương pháp nghiên cứu VSV học, 85 trang.
4. John G. H., Noel R. K., Peter H. A. S., James T. S., Stanley T. W., 1994. Bergey's manual of determinative bacteriol. 9th Edition. The Williams and Wilkin, Co., Baltimore: 94-125.
5. Lehej Čková R., K. Demnerová, B. Králová., 1986. Screening of microorganisms with uricase activity. Biotechnol. Letters. 8(5): 341-342.
6. Lotfy W. A. 2008. Production of thermostable uricase by a novel *Bacillus thermocatenulatus* strain. Biores. Tech. 99 (4): 699-702.
7. Nelson D. L., Cox M. M., 2004. Lehninger Principles of Biochemistry. Freeman, New York: 75-86.
8. Saeed H. M., Abdel-Fattah Y. R., Gohar Y. M., Elbaz M. A., 2004. Purification and characterization of extracellular *Pseudomonas aeruginosa* urate oxidase enzyme. Pol. J. Microb., 53: 45-52.
9. Sambrook J. and Russell D., 2001: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. (3rd ed.) Cold Springs Harbor Press, Cold Springs Harbor N.Y, 76 pages.
10. Yazdi M. T., Zarrini G., Mohit E., Faramarzi M. A., Setayesh N., Mohseni F. A., 2006. *Mucorhiemalis*: a new source for uricase production. World J. Microbiol. Biotechnol. 22: 325-330.
11. Zhou X., Ma X., Sun G., Li X., Guo K., 2005. Isolation of a thermostable uricase producing bacterium and study on its enzyme production conditions. Process Biochemistry 40 (12): 3749-3753.

ISOLATION, SELECTION AND ACTIVE DETERMINATION OF BACTERIA PRODUCE URICASE

Pham Thanh Ha, Tran Dinh Man, Tran Thi Hoa

Institute of Biotechnology, VAST

SUMMARY

Uricase producing bacteria was isolated from soil with a nutrient agar media containing uric acid. The isolation of bacteria was based on uricolytic activity on agar surface. A bacterial strain CN3 showed a maximum zone of clearance in short time had been chosen. Based on morphological and biochemical tests, as well as 16S rRNA sequence and phylogenetic tree analysis, the bacterial isolated was identified as *Pseudomonas putida*. The uricase was present as intracellular and extracellular enzyme in this strain. When the strain was cultured at 30°C and pH7 for 48h on nutrient broth media containing uric acid 0.5%, the extracellular uricase activity peaked at ~ 0.85 U/ml and intracellular uricase activity peaked at ~ 0.45 U/ml.

Keywords: Pseudomonas, isolation, uric acid, uricase.

Ngày nhận bài: 14-3-2012