

ỨNG DỤNG CÁC HẠT NANO PHÁT QUANG VÀO VIỆC ĐÁNH DẤU TẾ BÀO ĐỂ PHÁT HIỆN VÀ THEO DÕI CÁC LOẠI VI SINH VẬT

Tổng Kim Thuận¹, Trần Hồng Nhung², Trần Thanh Thủy¹, Phạm Công Hoat³, Phạm Minh Tân⁴, Jean Claude Brochon⁵, Patrick Tauc⁵, Nguyễn Thị Thanh Ngân⁶

¹Viện Công nghệ sinh học

²Viện Vật lý

³Bộ Khoa học và Công nghệ

⁴Trường Đại học khoa học, Đại học Thái Nguyên

⁵Phòng Nghiên cứu ứng dụng Công nghệ sinh học và dược học, Cachan, France

⁶Viện Khoa học vật liệu

TÓM TẮT

Với mục đích nghiên cứu sự sinh trưởng của nấm men *Lipomyces* và phát hiện sớm vi khuẩn gây bệnh thực phẩm ở mật độ thấp (vài chục đến vài trăm tế bào), chúng tôi đã sử dụng 2 loại hạt nano phát quang (chấm lượng tử quantum dot thương phẩm 605 và hạt silica chứa tâm màu rhodamine R6G chế tạo trong nước) để đánh dấu tế bào nấm men *Lipomyces starkeyi* và vi khuẩn gây bệnh *E. coli* O157:H7 theo cơ chế thẩm thấu qua màng tế bào và gắn kết không đặc hiệu. Chúng tôi đã đánh dấu thành công 2 loại tế bào vi sinh vật bằng các hạt nano phát quang nói trên. Kết quả cho thấy, đối với nấm men *Lipomyces*, chấm lượng tử xâm nhập vào bên trong tế bào theo cơ chế khuếch tán thẩm thấu tích cực và phân bố trong tế bào ở nhiều vị trí khác nhau như không bào và nguyên sinh chất. Chấm lượng tử quantum dot 605 sau khi xâm nhập vào trong tế bào vẫn phát quang sáng chói, cường độ phát quang không thay đổi sau 2 tháng và không ảnh hưởng đến kích thước, hình dáng tế bào. Tế bào nấm men được đánh dấu vẫn sinh trưởng và nảy chồi bình thường, tuy nhiên tốc độ sinh trưởng thấp hơn so với đối chứng. Tỷ lệ % chấm lượng tử xâm nhập vào trong tế bào phụ thuộc vào tuổi và nồng độ tế bào. Đối với tế bào non thì tỷ lệ xâm nhập của quantum dot vào tế bào cao hơn so với tế bào già. Tế bào sau 2 ngày nuôi cấy với mật độ 10^6 CFU/ml cho tỷ lệ đánh dấu cao nhất, khoảng 45%. Còn đối với vi khuẩn *E. coli* O157:H7 thì hạt nano silica chứa tâm màu R6G không xâm nhập vào bên trong tế bào mà chỉ bám dính trên bề mặt tế bào và phát quang chói. Cường độ phát quang của vi khuẩn *E. coli* O157:H7 gắn hạt silica phụ thuộc vào mức độ bám dính của hạt silica trên bề mặt tế bào. Ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử (TEM) cho thấy, các hạt nano silica bám không đồng đều trên bề mặt tế bào. So sánh số lượng vi khuẩn quan sát thấy dưới kính hiển vi truyền qua với số lượng vi khuẩn được đánh dấu phát quang dưới kính hiển vi huỳnh quang cho thấy, tỷ lệ % vi khuẩn *E. coli* O157:H7 được đánh dấu bởi hạt silica khá cao (42 - 81%). Các thí nghiệm nghiên cứu đánh dấu tế bào vi khuẩn *E. coli* O157:H7 bằng hạt nano silica vẫn đang tiếp tục, nhưng sẽ theo phương pháp gắn kết miễn dịch đặc hiệu kháng nguyên + kháng thể và thay hạt silica sản xuất trong nước bằng hạt silica chứa tâm màu thương phẩm.

Từ khóa: Chấm lượng tử quantum dot, đánh dấu tế bào, gắn kết không đặc hiệu, hạt nano silica phát quang, nấm men *Lipomyces*, thẩm thấu qua màng, vi khuẩn gây bệnh *E. coli* O157:H7

MỞ ĐẦU

Một trong những phương pháp được sử dụng rộng rãi để nghiên cứu sự sinh trưởng của các tế bào sống, các sản phẩm trung gian của quá trình chuyển hóa sinh học là phương pháp đánh dấu tế bào sống bằng các chất nhuộm màu. Phần lớn các chất chỉ thị hữu cơ này đều có tính phát quang. Tuy nhiên, vì chúng có bản chất hữu cơ nên không tồn tại lâu trong tế bào, cường độ phát sáng không mạnh và liên tục. Sự phát minh ra các hạt nano phát quang như một cuộc cách mạng trong khoa học kỹ thuật (Yan *et al.*,

2007). Bằng các kỹ thuật và phương pháp đánh dấu hiện đại, việc nghiên cứu sự sinh trưởng, phát triển của các tế bào sống nói chung và các quần thể vi sinh vật nói riêng ngày càng hoàn thiện. Ngoài ra, các hạt nano phát quang còn được ứng dụng trong việc phát hiện nhanh, chính xác số lượng vi khuẩn gây bệnh ở mật độ thấp (Zhao *et al.*, 2004).

Tính siêu sáng, bền vững và ổn định trong thời gian dài của các hạt nano phát quang (chấm lượng tử và hạt silica) là những đặc tính ưu việt trong việc sử dụng chúng như là chất đánh dấu cho các tế bào sống (Timothy *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2003).

Đối với chấm lượng tử thì những đặc tính của chúng hơn hẳn các chất nhuộm màu hữu cơ thông thường vì các tinh thể nano trơ, không thấm nước, không bị phân hủy và đặc biệt rất phù hợp với các điều kiện sống trong tế bào. Chúng không bị ảnh hưởng bởi sự thay đổi nhiệt độ, pH, hoạt động trao đổi chất của tế bào. Đặc biệt, vì chúng rất bền vững với ánh sáng, không giảm cường độ chiếu sáng trong thời gian dài nên các tế bào sống được đánh dấu bằng tinh thể nano chấm lượng tử có thể được quan sát, nghiên cứu trong thời gian dài (Medintz *et al.*, 2005).

Sản phẩm thương mại tinh thể nano chấm lượng tử như Qtracker 605 mà chúng tôi sử dụng trong nghiên cứu này được coi như các peptide đánh dấu để chuyển các tinh thể nano vào trong tế bào sống. Sự phân bố các tinh thể nano này không thông qua enzyme trung gian nên nó không mang tính đặc hiệu (Qtracker™ cell labeling protocol). Nó có thể áp dụng cho nhiều loại tế bào.

Còn đối với hạt nano silica phát quang gắn các lớp chức năng thì cũng có những tính chất đặc biệt giúp chúng trở thành chất đánh dấu sinh học tuyệt vời (He *et al.*, 2001; Timothy *et al.*, 2008). Thứ nhất, chúng chứa hàng nghìn phân tử màu bên trong khung silica nên độ bền quang tốt hơn, giúp quan sát được lâu hơn và giúp cho các phân tử màu không bị phá hủy bởi ánh sáng kích thích và các yếu tố môi trường. Chính vì vậy, các hạt nano gắn các nhóm chức năng cung cấp tín hiệu phát quang cực cao cho các phân tích sinh học và dễ dàng kết hợp với các phân tử nhận biết như kháng thể. Các tín hiệu này tăng lên hàng nghìn lần nên độ nhạy của phép đo cũng tăng lên nhiều lần.

Hạt nano silica phát quang chứa tâm màu hữu cơ có những ưu điểm vượt trội so với các phân tử màu thông thường khác là độ phát quang cao hơn, bền quang hơn. Nó đã được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực hiện ảnh và các phân tích sinh học siêu nhạy, bao gồm cả nhuộm tế bào và phát hiện DNA đích (He *et al.*, 2001; Timothy *et al.*, 2008), hướng đích chất nhận thụ cảm bề mặt tế bào (Yan *et al.*, 2007) và phát hiện siêu nhạy, nhanh, chính xác số lượng *E. coli* O157:H7, xác định vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* (Zhao *et al.*, 2004; Qin *et al.*, 2007) và phát hiện nhiều mầm bệnh cùng một lúc (Wang *et al.*, 2007). So sánh với hạt nano polymer cũng được sử dụng trong phân tích sinh học và đánh dấu tế bào, hạt nano silica ít bị co cụm hơn và ít bị nhạt màu hơn.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng cả 2 loại hạt nano để đánh dấu tế bào vi sinh vật (tinh thể

nano chấm lượng tử thương phẩm 605 để đánh dấu tế bào nấm men *Lipomyces*, hạt nano silica chứa tâm màu rhodamine chế tạo trong nước để đánh dấu tế bào vi khuẩn *E. coli* O157:H7). Các số liệu thu được là những kết quả bước đầu, làm cơ sở cho việc nghiên cứu quy trình xác định chính xác, nhanh, nhạy số lượng vi khuẩn gây bệnh *E. coli* O157:H7 và *Salmonella typhimurium* trong thực phẩm.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Nano chấm lượng tử Qtracker 605 thương phẩm (Invitrogen, Mỹ) gồm 2 thành phần đựng trong hai lọ riêng biệt: Thành phần A là các chấm lượng tử Qtracker 605 dưới dạng keo sền sệt, màu đỏ. Thành phần B là dung dịch đẩy (carrier), màu trắng ngà có tác dụng làm tăng khả năng xâm nhập của quantum dot vào trong tế bào (Qtracker™ cell labeling protocol), được bảo quản ở 4 - 25°C.

Các hạt nano silica phát quang chứa tâm màu rhodamine R6G được sản xuất thử nghiệm trong nước, tại Phòng quang phổ laser, Viện Vật lý, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chúng có hình dạng phỏng cầu, kích thước hạt dao động từ 15 - 20 nm, tan trong nước, bền quang, độ ổn định > 6 tháng trong dung dịch có pH 3,9. Phổ FTIR của chúng cho thấy, hạt có cấu trúc SiO₂ và các nhóm chức NH₂ và OH bao quanh. Bước sóng kích thích là 455 nm; bước sóng phát quang cực đại là 580 nm. Các hạt này được bảo quản ở 4°C.

Chủng vi sinh vật và nuôi cấy

Chủng nấm men *Lipomyces starkeyi* PT7.1 phân lập từ đất gò đồi Phú Thọ và hiện đang được sử dụng để sản xuất chế phẩm giữ ẩm đất Lipomycin được lưu giữ tại Phòng Công nghệ vật liệu sinh học, Viện Công nghệ sinh học. Chủng nấm men *L. starkeyi* được nuôi cấy lắc trong môi trường Hansen dịch thể ở 30°C. Lấy mẫu ở 2, 4 và 15 ngày để đánh dấu tế bào. Sau 2 ngày, OD₆₂₀ của dịch nuôi cấy đạt 1,264.

Chủng vi khuẩn *E. coli* O157:H7 do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp. Chúng được nuôi cấy lắc trên môi trường thạch thịt pepton (MPA) dịch thể ở 37°C. Sau 1 ngày nuôi cấy, OD₆₂₀ đạt 1,393.

Phương pháp đánh dấu tế bào nấm men

Lấy 1 µl dung dịch A (chấm lượng tử Qtracker 605) cho vào ống eppendorf + 1 µl dung dịch B (carrier). Trộn đều trên máy Vortex. Ủ trong 5 phút ở

hiệt độ phòng (25°C). Sau đó, bổ sung 0,2 ml dịch môi trường nuôi cấy vào hỗn hợp dung dịch A + B và lắc đều trong 30 giây trên máy Vortex. Tiếp theo, bổ sung 0,2 ml dung dịch đánh dấu (A + B) chứa Qtracker 605 vào ống chứa 1 ml dịch tế bào với nồng độ 10^6 CFU/ml và ủ ở 30°C trong 60 phút. Ly tâm 5 phút ở tốc độ 5000 vòng/phút và rửa 2 lần bằng môi trường nuôi cấy, ly tâm thu cạn. Hòa 0,2 ml môi trường vào cạn tế bào đã đánh dấu. Làm tiêu bản, soi kính quan sát tế bào được đánh dấu dưới hiển vi quang học, kính hiển vi huỳnh quang, kính hiển vi đồng tiêu và chụp ảnh các tế bào được đánh dấu. Mẫu đối chứng làm tương tự như trên nhưng không bổ sung Qtracker 605.

Xác định số lượng tế bào nấm men được đánh dấu

Phương pháp xác định số lượng tế bào nấm men *Lipomyces* được đánh dấu bằng Qtracker 605: quan sát và đếm số lượng tế bào phát quang dưới kính hiển vi huỳnh quang đảo trên buồng đếm hồng cầu Thoma-Goriev dưới độ phóng đại 40×10 tại nhiều vị trí khác nhau của tiêu bản. Tính tỷ lệ tế bào được đánh dấu (%): số tế bào được đánh dấu/tổng số tế bào (dưới kính hiển vi truyền qua) $\times 100$.

Phương pháp đánh dấu vi khuẩn

Hút 100 μ l dịch nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* O157:H7 với nồng độ 10^{6-8} CFU/ml cho vào ống eppendorf. Sau đó bổ sung 50 μ l hạt nano silica chứa tâm màu. Lắc đều mẫu trong 1 phút. Ủ mẫu ở 37°C trong 30 phút. Sau đó, ly tâm ở 10.000 v/phút trong 10 phút. Thu cạn và loại bỏ dịch bên trên chứa những hạt nano silica thừa không bám gắn với bề mặt vi khuẩn. Hòa cạn vào 100 μ l dung dịch đệm

PBS và ly tâm lần 2 để loại bỏ nốt những hạt silica không bám gắn với vi khuẩn còn sót lại sau lần ly tâm trước. Cuối cùng, hòa lại cạn vào 100 μ l PBS và đem dịch này đi soi dưới kính hiển vi truyền qua, kính huỳnh quang đảo và chụp ảnh.

Phương pháp đánh giá mức độ gắn kết của hạt nano silica với vi khuẩn *E. coli* O157:H7

Quan sát, đếm số lượng tế bào được đánh dấu và chụp ảnh chúng dưới kính hiển vi truyền qua và huỳnh quang đảo của Phòng Edward L. Cooperman, Viện Khoa học vật liệu. Đánh giá mức độ bám gắn của các hạt silica trên bề mặt vi khuẩn bằng việc phân tích ảnh tế bào vi khuẩn dưới kính hiển vi điện tử (TEM) của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đánh dấu tế bào *Lipomyces* bằng nano chấm lượng tử Qtracker 605

Ảnh hưởng của độ tuổi tế bào nấm men lên tỷ lệ tế bào được đánh dấu

Tế bào nấm men *L. starkeyi* sau 2 ngày nuôi cấy ở 30°C, dưới kính hiển vi quang học (100×10) phần lớn có hình tròn, hình cầu, kích thước khá lớn từ 4 đến 17 μ m. Dịch nuôi cấy sau 4 ngày và đặc biệt sau 15 ngày có độ nhớt rất cao, đó là do tế bào tiết một lượng lớn polysaccharide ngoại bào ra môi trường. Thành tế bào rất dày, xung quanh có lớp màng nhầy rất lớn. Giọt mỡ bên trong tế bào rất lớn, chiếm hầu hết thể tích bên trong tế bào.

Bảng 1. Ảnh hưởng của tuổi tế bào lên khả năng xâm nhập của Qtracker 605 vào tế bào nấm men *L. starkeyi*.

TB sau 2 ngày nuôi cấy		TB sau 4 ngày nuôi cấy		TB sau 15 ngày nuôi cấy	
Tổng số tế bào trên thị trường KHV	Tỷ lệ % số tế bào được đánh dấu	Tổng số tế bào trên thị trường KHV	Tỷ lệ % số tế bào được đánh dấu	Tổng số tế bào trên thị trường KHV	Tỷ lệ % số tế bào được đánh dấu
150 - 160	34 - 45	150	25	160	7
160 - 165	41 - 42	160	27	156	8
145 - 150	42 - 43	150	22	164	14
170 - 180	36 - 38	143	24	150	8
143 - 146	39 - 42	152	27	175	11
150 - 156	40 - 42	160	28	154	11

Kết quả bảng 1 cho thấy, tuổi của tế bào ảnh hưởng lớn đến việc xâm nhập của Qtracker 605 vào bên trong tế bào. Đối với tế bào non có thành tế bào

mỏng, chưa có lớp màng nhầy polysaccharide nên chấm lượng tử dễ dàng xâm nhập vào tế bào hơn tế bào già. Tỷ lệ % được đánh dấu cao nhất ở nấm men

2 ngày tuổi, đạt khoảng 45% và giảm dần theo thời gian nuôi cấy (còn khoảng 22% đối nấm men 4 ngày tuổi và 10% đối với tế bào 15 ngày). Kết quả này cũng phù hợp với kết quả đánh dấu tế bào vi khuẩn *Bacillus subtilis* bằng chấm lượng tử CdSe thông qua cơ chế phụ thuộc purine của Trường Đại học Công nghệ California, Mỹ (Kloepfer *et al.*, 2004) rằng, nếu sử dụng tế bào vi khuẩn ở pha ổn định và từ vong thì quantum dot rất khó xâm nhập vào trong tế bào.

Ảnh hưởng của nồng độ tế bào nấm men lên tỷ lệ tế bào được đánh dấu

Từ bảng 2 cho thấy, nồng độ tế bào cũng ảnh hưởng đến việc xâm nhập các QD 605 vào tế bào. Tỷ lệ % tế bào được đánh dấu cao nhất (34%) khi sử dụng dịch tế bào ở nồng độ 10^6 CFU/ml, còn khi sử dụng dịch tế bào ở nồng độ thấp hơn (10^2 - 10^4 CFU/ml) hoặc cao hơn 10^6 CFU/ml đều cho kết quả thấp hơn.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ tế bào lên khả năng xâm nhập của Qtracker 605 vào tế bào nấm men *L. starkeyi* (nuôi sau 2 ngày).

Nồng độ TB ù với QD 605	Số TB trên thị trường KHV	Số tế bào được đánh dấu bởi QD 605	Tỷ lệ % số TB được đánh dấu
10^2	8 - 14	0	0
10^4	22 - 32	8 - 11	29
10^6	144 - 164	50 - 60	34
10^7	450 - 523	125 - 145	27,7

Bảng 3. Ảnh hưởng của Qtracker 605 lên sự sinh sản và nảy chồi của tế bào được đánh dấu sau 2 tháng.

Số lượng tế bào khi đánh dấu	Tỷ lệ % tế bào nảy chồi khi đánh dấu	Số lượng tế bào sau 2 tháng đánh dấu	Tỷ lệ % tế bào nảy chồi sau đánh dấu
$1,5 \cdot 10^6$	18	$4,2 \cdot 10^6$	25

Sự phân bố và thời gian tồn tại của Qtracker 605 trong tế bào nấm men *Lipomyces*

QD 605 có thể tồn tại trong tế bào khá lâu và truyền qua nhiều thế hệ cháu. Sau 2 tháng tế bào nấm men được đánh dấu bằng QD 605 vẫn phát quang (Hình 1). Điều này cũng chứng minh sự không độc của các tinh thể nano chấm lượng tử đối với tế bào.

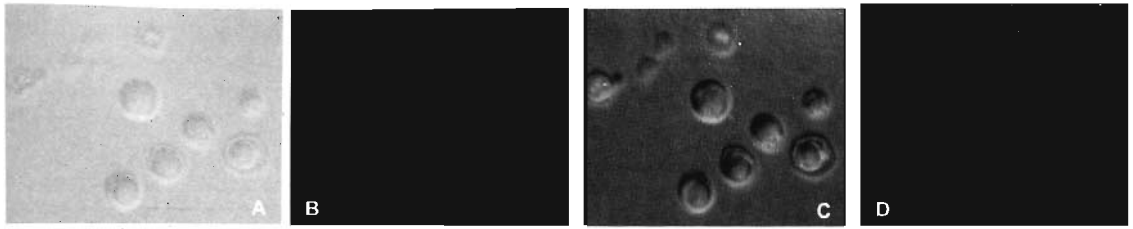
Chấm lượng tử Qtracker 605 sau khi xâm nhập vào tế bào nấm men có thể khu trú tại nhiều điểm trong tế bào: không bào, nguyên sinh chất, màng tế bào (Hình 2; 3).

Đối với tế bào non (2 ngày nuôi cấy), chấm lượng tử nằm chủ yếu trong không bào, phổ phát quang của

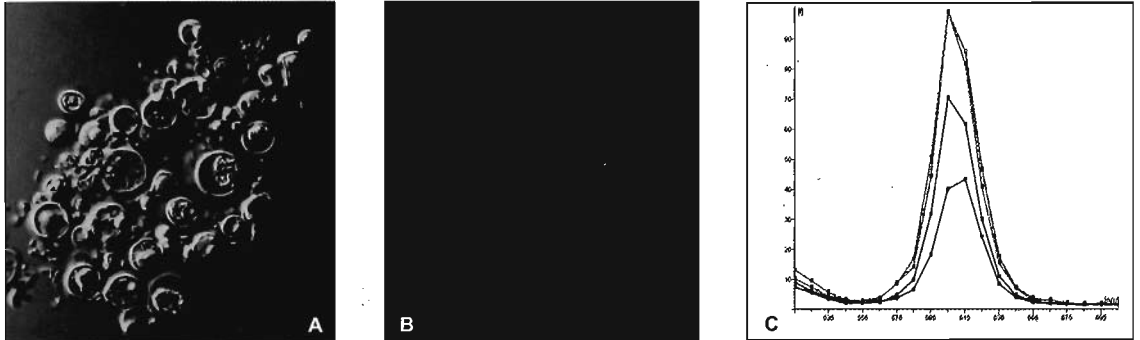
Ảnh hưởng của nano chấm lượng tử Qtracker 605 lên hình thái, kích thước và quá trình sinh trưởng và nảy chồi của tế bào nấm men *Lipomyces* khi bị đánh dấu

Từ hình 1 cho thấy, hình thái, kích thước tế bào nấm men *Lipomyces* không thay đổi khi bị đánh dấu, thậm trí sau 2 tháng bảo quản ở nhiệt độ 4°C. Sau khi Qtracker 605 chui vào tế bào, tế bào vẫn giữ được hình dáng, kích thước giống như tế bào đối chứng. Chúng đều có hình tròn, hình cầu. Kích thước vẫn dao động từ 4 đến 17 μm . Tế bào nảy chồi và sinh sản bình thường, các chấm lượng tử truyền qua nhiều thế hệ con cháu. Bảng 3 trình bày kết quả theo dõi, giám sát sự sinh trưởng và nảy chồi của tế bào sau 2 tháng. Sau 2 tháng, số lượng tế bào tăng lên gần 3 lần, tỷ lệ nảy chồi tăng 1,5 lần so với lúc ban đầu. Điều này chứng tỏ, chấm lượng tử Qtracker 605 không gây độc cho tế bào.

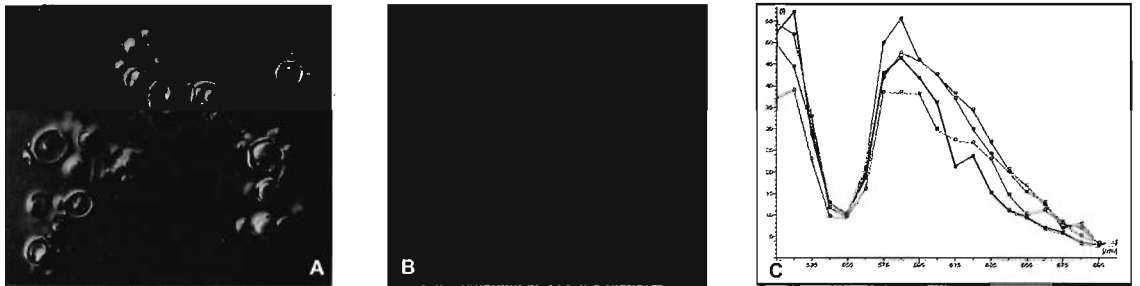
tế bào được đánh dấu có đỉnh và độ bán rộng trùng với phổ phát quang của Qtracker 605 (Hình 2). Điều này có thể giải thích là do Qtracker 605 nằm trong không bào là môi trường trong suốt nên phổ quan sát được không bị biến dạng. Còn đối với các tế bào già (sau 4 ngày nuôi cấy), Qtracker 605 nằm chủ yếu trong nguyên sinh chất (Hình 3) vì phổ phát quang của tế bào được đánh dấu có đỉnh dịch về phía sóng ngắn so với đỉnh phổ của Qtracker 605 và độ bán rộng bị giãn rộng so với độ bán rộng của Qtracker 605 dùng để đánh dấu (Hình 3c). Điều này có thể giải thích là do nguyên sinh chất tế bào không phải là môi trường trong suốt nên phổ quan sát được bị ảnh hưởng của môi trường này, do đó đỉnh phổ bị dịch ra. Ngoài ra, việc phổ bị giãn rộng chứng tỏ có sự tương tác giữa nguyên sinh chất và các Qtracker 605.



Hình 1. Ảnh các tế bào nấm men *L. starkeyi* được đánh dấu bằng Qtracker 605 sau 2 tháng (chụp bằng kính hiển vi đồng tiêu Leica TCS SL): A. Ảnh truyền qua; B. Kích thích laser Ar⁺ 488 nm; C. Chồng chập 2 ảnh huỳnh quang và truyền qua cho thấy vị trí của các QD trong tế bào; D. Kích thích hai photon laser Ti:Saphia 890 nm.



Hình 2. Tế bào nấm men được đánh dấu bằng Qtracker 605 sau 2 ngày nuôi cấy, QD nằm chủ yếu trong không bào. A. Ảnh truyền qua; B. Ảnh huỳnh quang; C. Phổ phát quang của tế bào có đỉnh và độ bán rộng trùng với đỉnh và độ bán rộng của QD đánh dấu. Kính hiển vi đồng tiêu Leica TCS SL, kích thích laser Ar⁺ 488 nm.



Hình 3. Tế bào nấm men được đánh dấu bằng Qtracker 605 sau 4 ngày nuôi cấy, QD nằm chủ yếu trong nguyên sinh chất. A. Ảnh huỳnh quang; B. Ảnh truyền qua; C. Phổ phát quang của tế bào có đỉnh ở 580 nm dịch về phía sóng ngắn so với đỉnh phổ của Qtracker 605 và độ bán rộng bị giãn rộng so với độ bán rộng của QD đánh dấu. Kính hiển vi đồng tiêu Leica TCS SL, kích thích laser Ar⁺ 488 nm.

Hình 4. Ảnh kính hiển vi điện tử (TEM) của *E. coli* O157:H7 sau khi ủ với hạt silica. Các hạt silica bám gần trên bề mặt tế bào không đồng đều.



Hình 5. Tế bào vi khuẩn *E. coli* O157:H7 được đánh dấu bằng hạt silica dưới kính hiển vi huỳnh quang. Độ phóng đại 1600 lần. Kích thích ở bước sóng 480 nm, phát quang ở bước sóng 580 nm.

Đánh dấu tế bào vi khuẩn gây bệnh *E. coli* O157:H7 bằng hạt nano silica phát quang

Chúng tôi đã đánh dấu thành công vi khuẩn *E. coli* O157:H7 bằng hạt silica chứa tâm màu rhodamine R6G sản xuất trong nước. Lúc đầu, khi ủ hạt silica với tế bào vi khuẩn trong dịch nuôi cấy MPA thì dưới kính huỳnh quang, quan sát thấy tế bào vi khuẩn phát quang chói, nhưng số lượng tế bào được đánh dấu không cao (< 35%). Đặc biệt, các hạt silica bị vón cục rất nhiều, chúng co cụm lại thành đám có kích thước khác nhau và phát quang rất chói. Khi sử dụng dịch nuôi cấy MPA để rửa sạch tế bào thì không tách hết được các hạt silica thừa không bám dính được trên mặt tế bào vi khuẩn nên nó ảnh hưởng đến việc quan sát và chụp ảnh huỳnh quang rất nhiều. Sau một thời gian nghiên cứu, chúng tôi đã thay dịch ủ bằng dung dịch đệm PBS thì tỷ lệ % số lượng tế bào được gắn kết với hạt silica tăng lên rất cao (đạt tới 80%) và không quan sát thấy hạt silica bị co cụm lại. Tế bào vi khuẩn được đánh dấu phát quang sáng chói (Hình 5), kích thước lớn hơn tế bào chưa đánh dấu. Khi rửa bằng dung dịch PBS, các hạt silica tự do không bám dính trên bề mặt tế bào đã bị loại bỏ hầu như hoàn toàn nên việc quan sát, đếm số lượng tế bào và chụp ảnh dưới kính huỳnh quang rất thuận lợi.

Cần nhấn mạnh rằng, độ phát quang của các tế bào vi khuẩn được đánh dấu giảm dần theo thời gian. Ngay sau khi đánh dấu, tế bào vi khuẩn phát quang rất chói, nhưng sau 2 - 3 ngày, độ phát quang đã suy giảm và hoặc không phát quang. Nguyên nhân của sự suy giảm cường độ phát quang theo thời gian của vi khuẩn được đánh dấu chưa được làm rõ, nhưng rất có thể liên quan đến chất lượng hạt silica.

Ảnh TEM (Hình 4) cho thấy, các hạt nano silica bám xung quanh tế bào nhiều lớp, không theo một trật tự nào. Các hạt silica phân bố trên bề mặt tế bào không đồng đều, ở một vài vị trí, chúng bị co cụm lại. Nếu hạt silica bám gắn càng nhiều trên bề mặt tế bào thì sự phát quang càng chói, nhưng do việc bám kết này xảy ra ngẫu nhiên nên đối với một số tế bào, số lượng hạt silica bám lên bề mặt chúng rất ít, nên chúng không thể phát quang được hoặc phát quang rất yếu. Điều này giải thích vì sao dưới kính hiển vi truyền qua, chúng tôi quan sát thấy rất nhiều tế bào vi khuẩn, còn cũng tại vị trí đó khi kích bước sóng phát quang 480 nm thì quan sát thấy ít tế bào vi khuẩn phát quang hơn.

Hơn nữa, tuy chúng ta đã sản xuất ra hạt silica chứa tâm màu rhodamine R6G có lớp chức năng sinh

học, nhưng chất lượng của chúng còn chưa ổn định. Điều này cũng ảnh hưởng lớn đến hiệu quả đánh dấu vi khuẩn *E. coli* O157:H7.

KẾT LUẬN

Đã ứng dụng thành công các hạt nano phát quang vào việc đánh dấu tế bào để phát hiện và theo dõi tế bào vi sinh vật.

Các Qtracker 605 đã xâm nhập được vào trong tế bào nấm men và phát quang với cường độ cao ở nhiều vị trí khác nhau của tế bào như không bào và nguyên sinh chất. Tỷ lệ % tế bào *Lipomyces* được đánh dấu phụ thuộc vào chất lượng QD 605, tuổi và nồng độ của tế bào. Dịch tế bào 2 ngày tuổi với nồng độ 10^6 CFU/ml cho hiệu quả đánh dấu cao nhất (khoảng 45%). Chấm lượng từ Qtracker 605 an toàn đối với tế bào sống. Khi xâm nhập vào tế bào, chúng không gây nên sự biến đổi kích thước, hình thái tế bào và quá trình sinh trưởng, nảy chồi của tế bào diễn ra bình thường. Thời gian tồn tại của Qtracker 605 sau khi xâm nhập vào tế bào khá dài. Sau 2 tháng tế bào *L. starkeyi* được đánh dấu vẫn phát quang chói và dễ dàng quan sát dưới kính huỳnh quang.

Tỷ lệ % tế bào vi khuẩn *E. coli* O157:H7 được đánh dấu khá cao, dao động trong khoảng 42 - 81%. Hạt nano silica đã bám gắn trên bề mặt thành tế bào vi khuẩn theo cơ chế không đặc hiệu và phát quang với cường độ cao thấp khác nhau, phụ thuộc vào mức độ bám gắn của hạt silica trên mặt tế bào vi khuẩn.

Đây là những kết quả bước đầu chứng minh khả năng ứng dụng các loại hạt nano phát quang thương phẩm và sản xuất trong nước vào việc đánh dấu tế bào vi sinh vật theo cơ chế không đặc hiệu.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện bởi kinh phí của Đề tài độc lập cấp Nhà nước mã số 14ĐTĐL. 2009T/29, giai đoạn 2009 - 2011 (Nghiên cứu ứng dụng các hạt nano phát quang vào việc đánh dấu tế bào để xác định số lượng vi khuẩn gây độc trong thực phẩm).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Chan WCW, Maxwell DJ, Gao X, Bailey RE (2003) Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Anal Biotechnol* 40: 56-62.

He X, Wang K, Tan W (2001) A novel fluorescent label based on biological fluorescent nanoparticles and its application in cell recognition. *Chin Sci Bulletin* 46(23): 1962-1965.

Kloepfer JA, Mielke RE, Nadeau JL (2004) Uptake of CdSe/ZnS Quantum Dots into bacteria via purine - dependent mechanisms. *Appl Environ Microbiol* 71(5): 2548-2557.

Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER, Mattoussi H (2005) Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat Mater* 4: 435-446.

Qin D, He X, Wang K, Zhao XJ, Tan W, Chen J (2007) Fluorescent nanoparticle-based indirect immunofluorescence microscopy for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biomed Biotechnol* 2007:

1-9.

Timothy J, Drake, Zhao XJ, Tan W (2008) Bioconjugated silica nanoparticles for bioanalytical applications. *Nanobiotechnology* 27(1): 444-457.

Wang L, Zhao WJ, O'Donoghue MB, Tan WH (2007) Fluorescent nanoparticles for multiplexed bacteria monitoring. *Bioconj Chem* 18: 297-301.

Yan J, Estevez MC, Smith JE, Wang K, He X, Wang L, Tan W (2007) Dye - doped nanoparticles for bioanalysis. *Nanotoday* 2(3): 44 - 50.

Zhao X, Hilliard LR, Mechery SJ, Wang Y, Bagwe RP, Jin S, Tan W (2004) A rapid bioassay for single bacterial cell quantitation using bioconjugated nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(42): 15027-15032.

UTILIZATION OF FLUORESCENT NANOPARTICLES FOR MULTIPLEX DETECTING AND MONITORING MICROORGANISMS

Tong Kim Thuan^{1, *}, Tran Hong Nhung², Tran Thanh Thuy¹, Pham Cong Hoat³, Pham Minh Tan⁴, Jean Claude Brochon⁵, Patrick Tauc⁵, Nguyen Thi Thanh Ngan⁶

¹Institute of Biotechnology

²Institute of Physics

³Ministry of Science and Technology

⁴College of Sciences, Thainguyen University

⁵Laboratory of Biotechnology and Applied Pharmacology, Cachan, France

⁶Institute of Materials Science

SUMMARY

We have carried out successfully the labelling of yeast and bacterial cells by fluorescent quantum dots and silica nanoparticles. For yeast cells *Lipomyces*, the results showed that the uptake of QDs into cells depended on age and number of cells. For young cells (2 days after culture) the QDs were mainly located in vacuoles. For the cells labeled at about 4 days and 15 days after culture, the QDs accumulated in cytoplasm. The fluorescence image of QDs labeled yeast cells were also taken after 2 months storage in dark at room temperature. The results showed that the labeled yeast cells were still alive after two months labeling; the cell size, shape and morphology were in normal state. The QDs accumulated in cytoplasm in the labeled cells. So, it can be said that the QDs did not affect cells and they were not harmful to the cells. For *E. coli* O157:H7 cells the fluorescence image showed that, ratio of silica nanoparticle - labeled cells/total was high. From TEM image, we could see that many silica nanoparticles were binding on the surface of the cell and the binding was inhomogeneously. The emission depended on binding level of the nanoparticles on the bacterial cell.

Keywords: Bacteria *E. coli* O157:H7, biolabeling, detection, fluorescent silica nanoparticle, non-special binding, pathogens, quantum dots, yeast *Lipomyces starkeyi*

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37564333/1117; Fax: 84-4-38363144; E-mail: tkthuan50@yahoo.com.vn