

PHÁT TRIỂN BIOSENSOR TỪ TẾ BÀO *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Y486 MANG PHỨC HỢP *CPR-CYP3A4* VÀ *DIN7-GFP* ĐỂ THỬ NGHIỆM PHÁT HIỆN HỢP CHẤT TIỀN UNG THƯ

Nguyễn Thị Thu Huyền¹, Bùi Văn Ngọc^{2,3,✉}

¹Trường Đại học Khoa học Thái Nguyên

²Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Học Viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: bui@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 09.5.2020

Ngày nhận đăng: 30.10.2020

TÓM TẮT

Trên thế giới và ở Việt Nam, mỗi ngày đều có một lượng lớn các chất độc hại từ các hoạt động công nghiệp, nông nghiệp, sản xuất thực phẩm và dịch vụ chăm sóc sức khỏe thải ra môi trường. Trong đó, nhiều hợp chất ngoại sinh bản chất là chất vô hại và không gây ung thư (tiền ung thư), nhưng khi vào cơ thể được hệ enzyme cytochrome P450 monooxygenase (CYP) chuyển hoá thành hợp chất nguy hại gây đột biến gen và có khả năng gây ung thư. Do đó, việc phát triển công cụ phân tích sinh học để nhanh chóng xác định các hợp chất tiền ung thư sẽ có ý nghĩa rất lớn trong công tác an toàn thực phẩm và kiểm soát môi trường. Mục tiêu của nghiên cứu này là tạo biosensor từ chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* Y486 được đồng biến nạp hai phức hợp promoter-gen là *CYP3A4-CPR* và *DIN7-GFP*. Kết quả cho thấy, protein tái tổ hợp đều được biểu hiện tốt ở tất cả các chủng biến nạp. Khối lượng phân tử của CPR và CYP3A4 tái tổ hợp lần lượt là 75 kDa và 56 kDa. Enzyme CYP3A4 chỉ thể hiện hoạt tính chuyển hoá khi được biểu hiện cùng với CPR. Các hằng số động học K_m , V_{max} , V_{max}/K_m của phức hệ enzyme CPR-CYP3A4 lần lượt tương ứng là 3,2 μ M, 3,5 pmol/pmol CYP/min, 1,1 μ L/pmol CYP/min. Khi đồng biểu hiện phức hợp enzyme này với phức hợp DIN7-GFP trong tế bào chủng Y486 đã xác định được aflatoxin B1 trong khoảng 0,1-0,4 μ M và benzo(c)phenanthrene trong khoảng 10-40 μ M. Tuy nhiên, biosensor này không phát hiện được sự có mặt của các hợp chất tiền ung thư khác như, *N*-Nitrosodimethylamine ở tất cả các nồng độ khảo sát. Đây là kết quả bước đầu cho việc tiếp tục phát triển các dạng biosensor để xác định nhiều hợp chất tiền ung thư khác trong tự nhiên thông qua việc thiết kế lại hệ biểu hiện hay thay thế các CYPs và promoter cảm ứng đặc hiệu khác nhau.

Từ khoá: cytochrome P450 monooxygenase (CYP), CYP3A4, hợp chất tiền ung thư, hằng số động học enzyme, NADPH cytochrome P450 reductase (CPR)

MỞ ĐẦU

Ô nhiễm thực phẩm và môi trường nói chung, ngộ độc thực phẩm và nước nhiễm chất độc hại nói riêng luôn là vấn đề nóng không chỉ ở Việt Nam mà trên toàn thế giới. Thực vậy, trong thực phẩm ô nhiễm có nguồn gốc từ ngũ cốc thường chứa aflatoxin B1 (Sapsford *et al.*, 2006), sữa hư hỏng có sterigmatocystin (Yao *et al.*, 2006) nước

bị ô nhiễm thường chứa các kim loại nặng hoặc trong nước thải công nghiệp có mặt các hợp chất hydrocarbon thơm đa vòng (PAHs) đều có khả năng gây ung thư (Siddens *et al.*, 2012). Để xác định các hợp chất này, người ta thường dùng các phương pháp phân tích hoá lý (HPLC), khối phổ (GC-MS) (McCoy *et al.*, 2008; Rodríguez Velasco *et al.*, 2003) hoặc các phương pháp hóa sinh như các dạng test ELISA (Gundinc *et al.*,

2009) và gần đây là các cảm biến sinh học (biosensor) được phát triển từ DNA, enzym, protein, plasmid.

Tuy nhiên, các phương pháp HPLC, GC-MS, cũng như các biosensor chế tạo từ DNA, enzym, protein... chỉ phù hợp cho việc phát hiện, định tính, định lượng một hợp chất chứ không đánh giá được ảnh hưởng về mặt sinh học như độc tính tế bào (cytotoxicity), độc tính gen (genotoxicity) của hợp chất đó. Hơn nữa, khi các chất độc hại là chất mới, chưa được xác định hoặc công bố thì các phương pháp trên không phù hợp nữa. Để giải quyết vấn đề này, các tế bào của vi khuẩn, đặc biệt là của nấm men thường được sử dụng để biểu hiện protein và tạo biosensor dạng tế bào (Gu *et al.*, 2004; Wada *et al.*, 2008). Bởi lẽ, tổng số gen tương đồng giữa người và nấm men là hơn 40%, các con đường sinh hóa giữa người và nấm men được bảo tồn cao, tế bào nấm men có ty thể, có nhân thật, nơi mà DNA nhiễm sắc thể được gói cuộn trong một cấu trúc bậc cao tương đồng với cấu trúc tìm thấy ở động vật có vú (Petranovic *et al.*, 2010) Ngược lại, những đặc điểm quan trọng này không tìm thấy ở vi khuẩn.

Để phát hiện và đánh giá độc tính gen, độc tính tế bào của hợp chất, biosensor thường được phát triển dựa trên việc biến nạp tổ hợp promoter-gen thông báo vào tế bào nấm men, trong đó hoạt động của promoter được cảm ứng bởi sự có mặt của hợp chất phân tích dẫn tới quá trình biểu hiện của gen thông báo tạo ra tín hiệu đo được. Một số promoter ở nấm men *Saccharomyces cerevisiae* như *RAD54*, *RNR2*, *PLM2* được nhiều nghiên cứu sử dụng làm yếu tố cảm ứng, trong khi gen mã hoá cho protein cùng tên GFP (green fluorescent protein) thường được sử dụng làm gen thông báo (Afanassiev *et al.*, 2000; Cahill *et al.*, 2004; Bui *et al.*, 2015). Tuy vậy, các dạng biosensor này chỉ có thể phát hiện và đánh giá các hợp chất gây biến đổi gen (genotoxin) hay gây ung thư (carcinogen), mà không phát hiện được các hợp chất tiền ung thư (procarcinogen) như aflatoxin B1, PAHs... Theo nhiều tài liệu báo cáo, ở người các cytochrome P450 (CYP) bên cạnh chức năng chuyển hoá và khử độc các chất ngoại lai (xenobiotics), CYP còn hoạt hoá các chất vô hại hay còn gọi là tiền ung thư

(procarcinogen) thành các chất có hại cho cơ thể như các hợp chất gây biến đổi gen (genotoxin) hoặc gây ung thư (carcinogen) (Walsh *et al.*, 2005; Guengerich *et al.*, 2008; Irigaray *et al.*, 2010; Luckert *et al.*, 2013). Lợi dụng tính chất này, chúng tôi đã sử dụng một số gen mã hoá cho các CYP như *CYP3A4*, *CYP2B6*, *CYP2D6* và *CPR* cùng biến nạp với tổ hợp *RAD54-GFP* vào nấm men tạo biosensor phát hiện các hợp chất tiền ung thư (Bui *et al.*, 2016). Tuy nhiên, các hệ thống đồng biểu hiện này mới thử nghiệm đánh giá được một vài hợp chất nhất định và có những hạn chế nhất định về độ đặc hiệu.

Với mục tiêu tạo thêm hệ thống biểu hiện nhằm đánh giá thêm về độ đặc hiệu và hợp chất mới, trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng phức hệ *DIN7-GFP* và *CPR-CYP3A4* được đồng biểu hiện vào tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* Y486 tạo cảm biến sinh học mới và sử dụng trong nhận biết ba hợp chất tiền ung thư, aflatoxin B1 (AFB1), benzo(c)phenanthrene và N-nitrosodimethylamine (NDMA).

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên vật liệu

Chủng *E. Coli* DH5 α TM đã biến nạp riêng rẽ các plasmid *DIN7-GFP-pUMGP5*, *CPR-pESC*, *CYP3A4-pESC*, *CPR-CYP3A4-pESC* tạo ra bốn chủng tái tổ hợp tương ứng. Chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (Y486 wt) được cung cấp bởi Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Bốn hợp chất thử nghiệm đã được lựa chọn và chuẩn bị trong các dung dịch gốc như sau: 0,8 μ M aflatoxin B1 (249,82 ng/mL; AFB1), 80 μ M benzo(c)phenanthrene (18,26 μ g/mL; B(c)P), 80 mM N-nitrosodimethylamine (5,9mg/mL; NDMA); Đối chứng dương 0.1 mM methyl methanesulfonate (11,01 μ g/mL); các hóa chất, dung môi và các enzym sử dụng trong nghiên cứu này được cung cấp từ các hãng Merck (Đức), Fermentas (Mỹ), New England Biolabs (Đức).

Plasmid pESC mang gen chỉ thị chọn lọc

URA3 và gen kháng kháng sinh ampicilin dùng để biểu hiện gen *CPR* và *CYP3A4* được cung cấp bởi Stratagene (Agilent Technologies, Stratagene, Santa Clara, CA, USA). Kháng thể đặc hiệu của CPR và CYP được cung cấp bởi Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Kháng thể thứ cấp liên kết với enzyme phosphatase kiềm (anti-Mouse-IgG-AP hoặc anti Rabbit-IgG-AP) cung cấp bởi hãng Sigma. Màng nitrocellulose được cung cấp bởi Pall GmbH (Dreieich, Đức).

Môi trường SD/-URA (Synthetic Drop-out Uracine), môi trường F1 (Afanassiev *et al.*, 2000) sử dụng đánh giá độc tính gen, độc tính tế bào.

Môi trường SD/-URA; F1/-Ura sử dụng cho biểu hiện CYP450 và CPR: glucose được thay thế bằng galactose với lượng tương đương (2%) cộng với 0,5% raffinose và 0,02% G418.

Phương pháp

Biến nạp plasmid thông báo vào tế bào nấm men bằng phương pháp sốc nhiệt

Plasmid thông báo sau khi được chúng tôi thiết kế, tạo dòng và kiểm tra đoạn chèn được biến nạp vào tế bào nấm men bằng phương pháp được Gietz và cs phát triển (Gietz *et al.*, 2007). Tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* từ canh trường nuôi cấy được li tâm ở tốc độ 3500 rpm rồi được rửa lại bằng 500 μ L dung dịch LioAc 100 mM, ủ tại tủ lạnh 30°C, 800 rpm, trong 30 phút. Bổ sung 50 μ L dịch tế bào vào ống nghiệm có chứa sẵn 3 μ L plasmid, ủ tại 30°C trong 20 phút. Thêm 300 μ L dung dịch PEG 40% hòa tan trong 100 mM LioAc, ủ tại 30°C trong 20 phút. Sau đó, bổ sung 35,5 μ L DMSO, rồi tiến hành sốc nhiệt tại 42°C trong 15 phút. Ly tâm 7000 rpm trong 3 phút, loại bỏ dịch nổi. Hòa tan cặn thu được trong 1 mL môi trường YPD, ủ trong tủ lạnh 30°C, 850 rpm trong 3 giờ. Sau đó tiến hành li tâm 3500 rpm trong 5 phút, thu cặn. Cặn tế bào được hòa tan trong phần dịch còn lại và được cấy trang đều lên môi trường thạch SD/-URA. Sau đó được ủ qua đêm trong tủ 30°C.

Quan sát sự biểu hiện của protein GFP dưới kính hiển vi huỳnh quang

Tế bào nấm men từ đĩa thạch môi trường SD-URA được nuôi trong môi trường SD-URA dịch, ủ qua đêm trong tủ lạnh 30°C, 250 rpm. Bổ sung thêm môi trường SD-URA dịch vào dịch mẫu nuôi sao cho OD đạt 0.2 và dịch mẫu được chia làm 2 bình tam giác lần lượt: bình đối chứng (không bổ sung hóa chất) và bình bổ sung thêm MMS (0,2 mM). Sau đó, ủ trong tủ lạnh 30°C, 250 rpm trong khoảng 16 h, tiến hành soi dưới kính hiển vi huỳnh quang. Vật kính được sử dụng có độ phóng đại 10.000 lần, bước sóng kích thích/phát xạ được sử dụng là 485/535 nm (màu xanh lục).

Biến nạp vector đồng biểu hiện pESC-CPR-CYP3A4 vào tế bào *Sacharomyces cerevisiae* Y486

Vector tái tổ hợp được chúng tôi thiết kế và tạo dòng được biến nạp vào tế bào *S. cerevisiae* (Y486) bằng phương pháp được Gietz và cs phát triển (Gietz *et al.*, 2007). Tế bào biến nạp và plasmid tái tổ hợp được duy trì trong suốt quá trình tăng sinh và phân bào bằng cách tiếp tục chọn lọc trên môi trường thạch không có uracil, SD/-Ura agar (Clontech, TaKaRa, Pháp). Các chủng biến nạp được nuôi cấy trong môi trường SD/-Ura chứa 2% galactose và 0,5% raffinose ở 30°C, lắc tại 220 vòng/phút. Sau 24 giờ nuôi cấy, thu hoạch tế bào nấm men bằng cách ly tâm (3000 g, 4°C, 10 phút). Cặn tế bào (pellet) được hồi phục trong đệm đồng nhất (50 mM phosphate kali, pH 7.9, 1 mM EDTA, 5% glycerol, 2 mM DTT, 1 mM PMSF) tới OD₆₀₀ = 20. Huyền phù tế bào được thêm vào 1 g hạt thủy tinh đã rửa axit (đường kính 0,4–0,5 mm, Sigma Aldrich). Tế bào được phá bằng voltex (3x5 phút, xen giữa mỗi lần là các bước làm mát trên đá) bằng máy Mixer Mill MM 300 (Retsch, Haan, Đức). Phần nổi phía trên được tách ra khỏi các mảnh vụn và hạt thủy tinh bằng cách ly tâm tại 14 000 g ở 4°C trong 15 phút (Hettich, Tübingen, Đức). Sau đó tiến hành siêu li tâm dịch nổi tại 100 000 vòng trong 1 giờ ở 4°C (Beckman Coulter, Krefeld, Đức) thu các microsome chính là các protein CPR, CYP3A4.

Các protein này được giữ trong đệm đồng nhất và dùng cho các thử nghiệm tiếp theo.

Phương pháp Western Blot

Protein sau khi được phân tách bằng phương pháp điện di trên gel SDS-PAGE (Sambrook *et al.*, 2001), được chuyển lên màng nitrocellulose trong đệm tris-glycin (tris 25 mM, glycerin 142 mM) có 20% methanol ở dòng điện 15 V trong 30 phút. Trong quá trình điện chuyển, vị trí các băng protein vẫn được giữ nguyên. Tiếp theo bao gồm các bước sau: rửa màng 2 lần bằng đệm TBS (tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM); cố định màng 30 phút 2 lần bằng dung dịch đệm TBS được bổ sung BSA (3%) hoặc sữa đa tách kem (5%); rửa màng trong 10 phút và lặp lại 2 lần trong đệm TBST (TBS bổ sung Tween 20 (0,1%) sau đó rửa 10 phút trong đệm TBS; ủ màng với kháng thể sơ cấp đặc hiệu với CPR và CYP3A4 trong 1 giờ tại 37°C; loại bỏ kháng thể sơ cấp bám không đặc hiệu trên màng bằng cách rửa trong đệm TBS; ủ màng với kháng thể thứ cấp thích hợp có gắn với phosphatase kiềm tỉ lệ pha loãng 1:1000 trong đệm TBS; rửa màng 4 lần trong TBST. Kháng thể được nhận biết bằng việc ủ trong dịch cơ chất phát màu: 1 mL dung dịch NBT (nitroblue tetrazolium), 1 mL dung dịch BCIP (5-bromo-4-chloroindolyl phosphate) và 100 mL dung dịch đệm (Tris 0,1 M, MgCl₂ 0,5 mM, pH 9,5). Phản ứng của cơ chất được dừng lại khi ủ trong nước khử ion.

Phương pháp xác định hoạt tính CPR (Guengerich *et al.*, 2009)

Hoạt tính của CPR được xác định bằng phương pháp quang phổ kế thông qua việc đo tốc độ khử cytochrome c khi có mặt NADPH (Sigma Aldrich). 500 µg cytochrome c (Sigma Aldrich) hoà trong đệm potassium phosphat (50 mM, pH 7,5) được trộn lẫn với 100 µg microsome protein (chứa CPR), sau đó định mức bằng đệm potassium phosphat đến 950 µL. Phản ứng được bắt đầu khi thêm 50 µL dung dịch NADPH 12 mM (mới pha trước khi phản ứng). Biến thiên độ hấp thụ được ghi lại ở bước sóng 550 nm trong 20 giây trên máy quang phổ kế UV/Vis SmartSpec Plus (Bio-Rad). Hoạt tính của CPR được tính toán theo định luật Beer Lambert qua

phương trình sau: $\Delta OD_{550}/\text{phút}/\epsilon$, trong đó ΔOD_{550} là biến thiên độ hấp thụ đo được ở 550 nm, ϵ là hằng số tắt và bằng 21 mM⁻¹ cm⁻¹. Một đơn vị enzyme được định nghĩa là µmol/phút.

Phương pháp xác định hoạt tính của enzyme CYP3A4 (Guengerich *et al.*, 2009)

Hoạt tính của CYP3A4 được xác định dựa trên quá trình xúc tác phản ứng deethyl hóa cơ chất 7-ethoxycoumarin tạo ra sản phẩm phát huỳnh quang 7-hydroxycoumarin: Dung dịch cơ chất bao gồm 2,5 mM 7-ethoxycoumarin-3-carbonitrile (Sigma Aldrich, Đức) hoà tan trong đệm potassium phosphate (100 mM, pH 7,4), 3 mM NADPH và 0,02% (v/v) pluronic F-68 (Sigma Aldrich) được ủ trước trong vi đĩa 96 giếng thành màu đen và đáy phẳng trong suốt (định dạng đĩa 8 x 12, Greiner Bio-one, Đức) ở 37°C trong 5 phút và sau đó trộn với 200 µg CYP3A4 trong đệm potassium phosphat (100 mM, pH 7,4) để đạt tổng thể tích phản ứng 250 µL trên mỗi giếng. Tín hiệu huỳnh quang được đo tại 405 nm (bước sóng kích thích) và 460 nm (bước sóng phát xạ) và được ghi lại mỗi 10 phút trong thời gian 120 phút bằng máy đọc vi đĩa (Safire Microplate, Tecan, Thụy Sĩ) được điều khiển bằng phần mềm XFLUOR4 SAFIRE II. Các tham số động học (V_{max} , K_m , V_{max}/K_m) được tính toán thông qua việc xác định hoạt độ enzyme tại 10 nồng độ cơ chất khác nhau (10 - 100 µM), được biểu diễn gián tiếp trên đồ thị dạng tuyến tính Lineweaver-Burk hoặc biểu diễn trực tiếp trên đồ thị dạng phi tuyến tính của phương trình Michaelis Menten sử dụng các hàm hồi quy phi tuyến tính *nls* R như đã mô tả trong các nghiên cứu trước đây của chúng tôi (Bui *et al.*, 2016).

Đồng biến nạp hai loại plasmid khác nhau tạo biosensor mới từ tế bào *Sacharomyces cereviciae* Y486 và thử nghiệm phát hiện các hợp chất tiền ung thư

Một plasmid được hình thành trong nghiên cứu này (đã được mô tả ở trên) mang cả gen CPR và CYP3A4, một plasmid được tạo ra và sử dụng trong các nghiên cứu trước của chúng tôi (Bui *et al.*, 2016) mang cấu trúc gen thông báo DIN7-GFP được biến nạp đồng thời vào chủng *Sacharomyces cereviciae* Y486. Đối với quá

trình đồng biến nạp, các bước giống như đã đề cập ở trên, nhưng môi trường SD/-Ura đã được bổ sung thêm 0,2 mg/mL kháng sinh (G418) để chọn lọc dòng đồng biến nạp. Các dòng tế bào đồng biến nạp này gọi là Biosensor và được sử dụng để phát hiện và phân tích các chất gây đột biến gen bao gồm cả MMS (đối chứng dương), gây ung thư và tiền ung thư AFB1, B(c)P và NDMA.

Quá trình phân tích được thực hiện trên đĩa 384 giếng (định dạng giếng 24 x 16, Greiner Bioone, Đức) với thành màu đen và đáy phẳng trong suốt. Mỗi nồng độ chất cần phân tích được lặp lại ba lần tại 3 giếng khác nhau để lấy giá trị trung bình và tính toán độ lệch chuẩn (SD). Sau đó, đĩa được đậy bằng màng thoáng khí. Trong nghiên cứu này, tất cả các phép đo huỳnh quang được thực hiện sau 16 giờ ủ ở 30°C có lắc nhẹ trong máy đọc vi đĩa (thiết bị đo huỳnh quang) nhằm đảm bảo sự thoáng khí hay quá trình hô hấp của nấm men. Cường độ huỳnh quang được đo tại 485 nm (bước sóng kích thích) và 535 nm (bước sóng phát xạ), đồng thời đo độ hấp thụ tế bào tại 600 nm hay OD₆₀₀. Quy trình phân tích và đánh giá độc tính gen bao gồm các bước: thiết kế thí nghiệm trên đĩa 384 giếng, phối trộn chất phân tích, bổ sung dịch nuôi nấm men, đo cường độ huỳnh quang, xử lý và phân tích dữ liệu được mô tả đầy đủ trong các nghiên cứu trước đây của chúng tôi (Bui *et al.*, 2015, 2016).

Tính toán, xử lý và biểu diễn kết quả

Cường độ huỳnh quang riêng (GFP_{riêng}) của mỗi giếng được tính bằng cách lấy cường độ huỳnh quang của mỗi giếng (xử lý hoặc đối chứng) chia cho mật độ tế bào tương ứng (OD₆₀₀) đo được của chính giếng đó (xử lý hoặc đối chứng). Tiếp theo, số lần cảm ứng huỳnh quang so với mẫu đối chứng được tính bằng cách lấy cường độ huỳnh quang riêng của giếng xử lý (GFP_{riêng, xử lý}) chia cho cường độ huỳnh quang của giếng đối chứng (GFP_{riêng, đối chứng}). Quá trình tính toán được tóm tắt dưới dạng công thức như sau: $GFP_{xử\ lý\ hoặc\ đối\ chứng} / OD_{600\ xử\ lý\ hoặc\ đối\ chứng} = GFP_{riêng}$; $GFP_{riêng, xử\ lý} / GFP_{riêng, đối\ chứng} = (\text{số lần cảm ứng}, GFP\ \text{fold induction})$. Số lần cảm ứng $\geq 1,3$ lần được coi là có khả năng gây độc gen

(Cahill *et al.*, 2004). Khả năng gây độc tế bào được xác định thông qua tỷ lệ phần trăm (%) tế bào sinh trưởng khi xử lý với hoá chất so với mẫu không xử lý hay đối chứng (100%). Tỷ lệ % tế bào xử lý với hoá chất/đối chứng nằm trong khoảng 30 - 80% được cho là gây độc tế bào (Cahill *et al.*, 2004).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Biến nạp plasmid thông báo DIN7-GFP-pUMGP vào tế bào nấm men

Biosensor dạng tế bào được tạo ra bằng cách biến nạp plasmid *DIN7-GFP-pUMGP5* vào tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (Y486 wt) theo phương pháp sốc nhiệt. Tiến hành chọn lọc bằng cây trang trên môi trường thạch SD/-URA. Kết quả cho thấy có xuất hiện khuẩn lạc mọc trên bề mặt thạch. Theo lý thuyết, những tế bào nấm men bình thường không thể sinh trưởng trên môi trường SD/-URA do thiếu nguyên liệu cho quá trình tổng hợp ARN của tế bào. Do đó, những khuẩn lạc xuất hiện là những khuẩn lạc có chứa plasmid *DIN7-GFP-pUMGP5* mang gen có khả năng tổng hợp uracil.

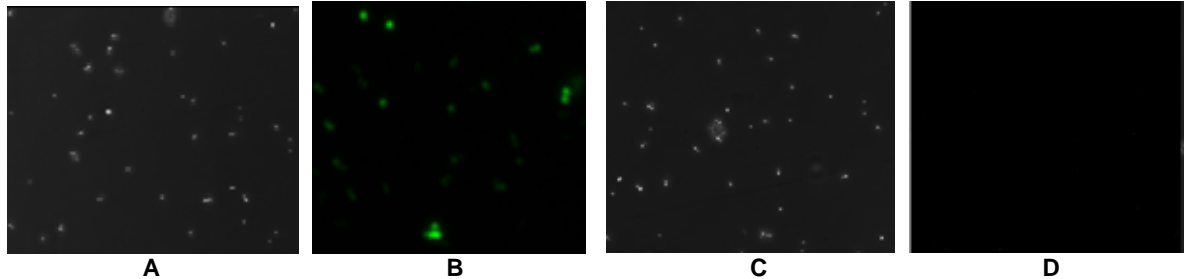
Quan sát biểu hiện huỳnh quang dưới kính hiển vi

Để kiểm tra kết quả tạo biosensor, chúng tôi tiến hành chọn ngẫu nhiên một số khuẩn lạc trên đĩa thạch SD/-URA và nuôi trên môi trường dạng dịch có bổ sung 0,2 mM MMS. Sau 16 giờ nuôi ủ ở nhiệt độ 30°C, tế bào nấm men được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang. Kết quả được trình bày ở Hình 1.

Kết quả cho thấy, có sự khác biệt về hình ảnh thu được trong các điều kiện khác nhau. Khi soi mẫu dưới kính hiển vi với ánh sáng trắng các tế bào nấm men với hình thái đặc trưng xuất hiện ở cả mẫu xử lý với MMS và mẫu đối chứng (Hình 1A và 1C). Ngược lại, khi soi mẫu dưới ánh sáng huỳnh quang tại cặp bước sóng kích thích/phát xạ tương ứng là 485/535 nm các tế bào nấm men phát huỳnh quang xanh lục ở mẫu xử lý với MMS (Hình 1B), nhưng không có tín hiệu huỳnh quang phát ra ở mẫu đối chứng (Hình 1D). Điều đó cho thấy promoter *DIN7* chỉ được kích hoạt khi có

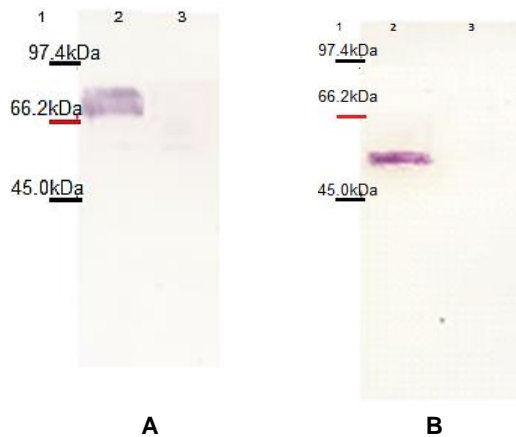
mặt MMS, dẫn đến quá trình phiên mã, biểu hiện gen *GFP* và phát tín hiệu huỳnh quang. Ngoài ra, còn chứng tỏ rằng vector thông báo *DIN7-GFP-*

pUMGP5 đã được biến nạp thành công vào tế bào nấm men và cấu trúc promoter–gen, *DIN7-GFP*, hoạt động bình thường.



Hình 1. Quan sát tế bào nấm men *S. cerevisiae* Y486 dưới kính hiển vi huỳnh quang (Độ phóng đại 10.000 lần). A: Chủng tái tổ hợp xử lý với MMS (ánh sáng trắng); B: Chủng tái tổ hợp xử lý với MMS (ánh sáng huỳnh quang); C: Chủng đối chứng (ánh sáng trắng); D: Chủng đối chứng (ánh sáng huỳnh quang: 485 (sóng kích thích)/535nm (sóng phát xạ)).

Kiểm tra sự biểu hiện của CPR và CYP3A4



Hình 2. Kiểm tra sự biểu hiện của CPR và CYP3A4 ở chủng biến nạp cả hai vector *DIN7-GFP-pUMGP5* và *CPR-CYP3A4-pESC* bằng kỹ thuật Western Blot. Giếng 1: Marker; Giếng 2: microsome của chủng mang vector tái tổ hợp lai với kháng thể của CPR (A) và lai với kháng thể CYP3A4 (B); Giếng 3: đối chứng âm.

Vector đồng biểu hiện *CPR-CYP3A4-pESC* và vector thông báo mang cấu trúc *DIN7-GFP-pUMGP5* được đồng thời biến nạp vào tế bào nấm men *S. cerevisiae* Y486. Thể biến nạp được nuôi trên môi trường chọn lọc không có uracil, nhưng bổ sung kháng sinh G418. Những khuẩn lạc mọc là những dòng mang cả hai vector, vector đồng biểu hiện (*CPR-CYP3A4-pESC*) và vector thông báo (*DIN7-GFP-pUMGP5*).

Protein tái tổ hợp, CPR và CYP3A4, sau khi được phân tách trên gel SDS-PAGE được chuyển lên màng nitrocellulose để lai với kháng thể đặc hiệu tương ứng (Hình 2A và 2B).

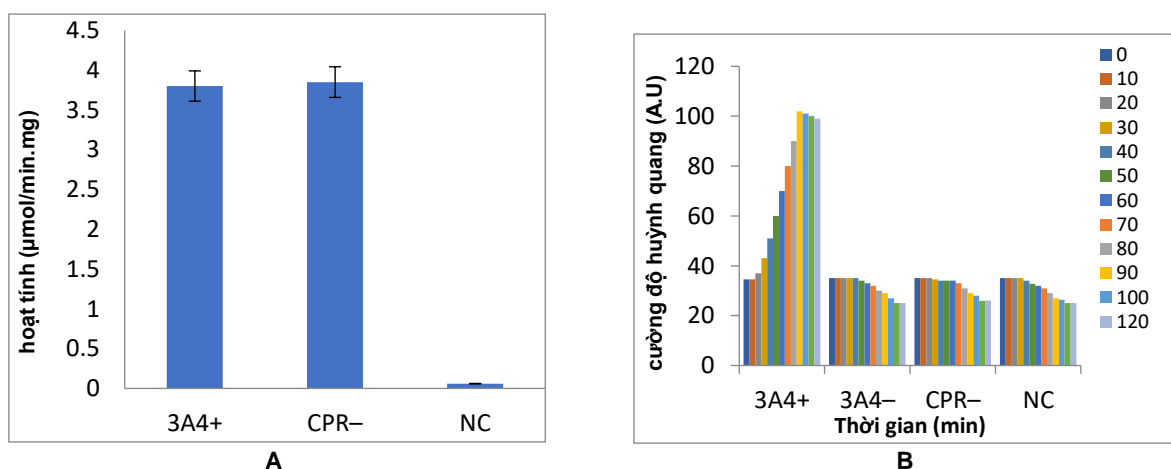
Kết quả phân tích Western blot cho thấy các băng protein quan sát được đúng với kích thước của CPR và CYP3A4 theo lý thuyết. Trong đó, băng đậm (Hình 2A, Giếng 2) với kích thước khoảng 75 kDa tương ứng với kích thước của CPR, băng nhạt (Hình 2B, Giếng 2) với kích thước khoảng 56 kDa tương ứng với kích thước của CYP3A4. Điều đó cho thấy, ở các chủng mang vector đồng biểu hiện, cả hai protein tái tổ hợp đều được biểu hiện. Tuy nhiên, sẽ là ý nghĩa hơn nếu hai protein enzyme này thể hiện hoạt tính chuyển hoá của chúng. Do đó, bước tiếp theo là cần xác định hoạt tính xúc tác và tính toán các hằng số động học của hai enzyme này khi chuyển hoá các cơ chất đặc hiệu của chúng.

Xác định hoạt tính của CPR và CYP3A4

Kết quả biểu diễn trong Hình 3 cho thấy hoạt tính của CPR được thể hiện ở cả dòng mang vector đồng biểu hiện hai protein enzyme (*pESC-CPR-CYP3A4*) hoặc chỉ mang CPR (*pESC-CPR-*). Tuy nhiên, các dòng chỉ mang vector *pESC* và *pUMGP5* (đối chứng âm) không thể hiện hoạt tính xúc tác của CPR, mặc dù bản thân *S. cerevisiae* cũng có hệ enzyme oxidoreductase nội sinh. Điều đó cho thấy bất kỳ

thể biến nạp nào mang gen mã hoá cho CPR đều có thể tham gia xúc tác quá trình khử cytochrome c. Khác với hoạt tính CPR, hoạt tính CYP3A4 chỉ được thể hiện ở các dòng 3A4+ mang vector đồng biểu hiện pESC-CPR-CYP3A4, các dòng còn lại đều không thể hiện hoạt tính xúc tác trong việc chuyển hoá cơ chất 7-ethoxycoumarin-3-carbonitrile thành sản phẩm 7-hydroxycoumarin (Hình 3B). Điều này khẳng định hoạt tính xúc tác của CYP3A4 cần nguồn điện tử và CPR là nguồn cung cấp điện tử. Thực vậy, ở các dòng CPR- chỉ mang vector pESC-CYP3A4, khi không có nguồn cung điện tử hoạt tính xúc tác của CYP3A4 đã không được ghi nhận (Hình 3B). Kết quả này tương tự so với kết quả chúng tôi tiến hành trước đây khi xác định hoạt tính chủng chỉ biến nạp một vector (CPR-CYP3A4-pESC) (Bui *et al.*, 2016) cũng như có tính tương đồng khi đồng biểu hiện CPR-CYP2D6 ở nấm men *Pichia pastoris* (Dietrich *et al.*, 2005). Khi chuyển hoá với các nồng độ cơ chất 7-ethoxycoumarin-3-carbonitrile khác nhau và sử dụng hàm hồi quy phi tuyến tính *nls* R, các

hằng số động học Michaelis Menten đã được xác định: hằng số ái lực giữa enzyme và cơ chất $K_m = 3,2 \mu\text{M}$, vận tốc phản ứng cực đại $V_{\text{max}} = 3,5 \text{ pmol/pmol CYP/min}$ và hiệu suất phản ứng $V_{\text{max}}/K_m = 1,1 \mu\text{L/pmol CYP/min}$. Trong đó, K_m là hằng số có tính chất quyết định đến việc lựa chọn cơ chất, khi trị số K_m càng nhỏ ái lực enzyme-cơ chất càng lớn, tốc độ và hiệu suất phản ứng càng cao và ngược lại. Thực vậy, khi cùng được biểu hiện ở *S. cerevisiae* và cơ chất là (3S)-3-hydroxyquinidine (Raghevendran *et al.*, 2006), trị số $K_m = 74,2 \mu\text{M}$, tức ái lực giữa CYP3A4 và cơ chất khá thấp. Do vậy, có thể kết luận rằng cơ chất 7-ethoxycoumarin-3-carbonitrile khá thích hợp với CYP3A4 ($K_m = 3,2 \mu\text{M}$). Kết quả xác định hoạt tính enzyme, các thông số động học là tương đồng giữa chủng đồng biến nạp hai vector trong nghiên cứu này và chủng chỉ biến nạp một vector biểu hiện như trong nghiên cứu trước của chúng tôi (Bui *et al.*, 2016). Như vậy, quá trình biến nạp đồng thời hai vector không làm ảnh hưởng đến sự biểu hiện của các protein tái tổ hợp.



Hình 3. Kiểm tra hoạt tính của CPR (A) CPY3A4 (B) của các chủng biến nạp cả hai vector riêng rẽ: 3A4+, chủng mang vector đồng biểu hiện pESC-CPR-CYP3A4 và pUMGP5-DIN7-GFP; 3A4- và CPR-, các chủng mang vector pESC-CYP3A4- hoặc pESC-CPR- và pUMGP5-DIN7-GFP; NC, đối chứng âm mang vector pESC và pUMGP5.

Xác định và đánh giá tín hiệu huỳnh quang của các chủng tái tổ hợp

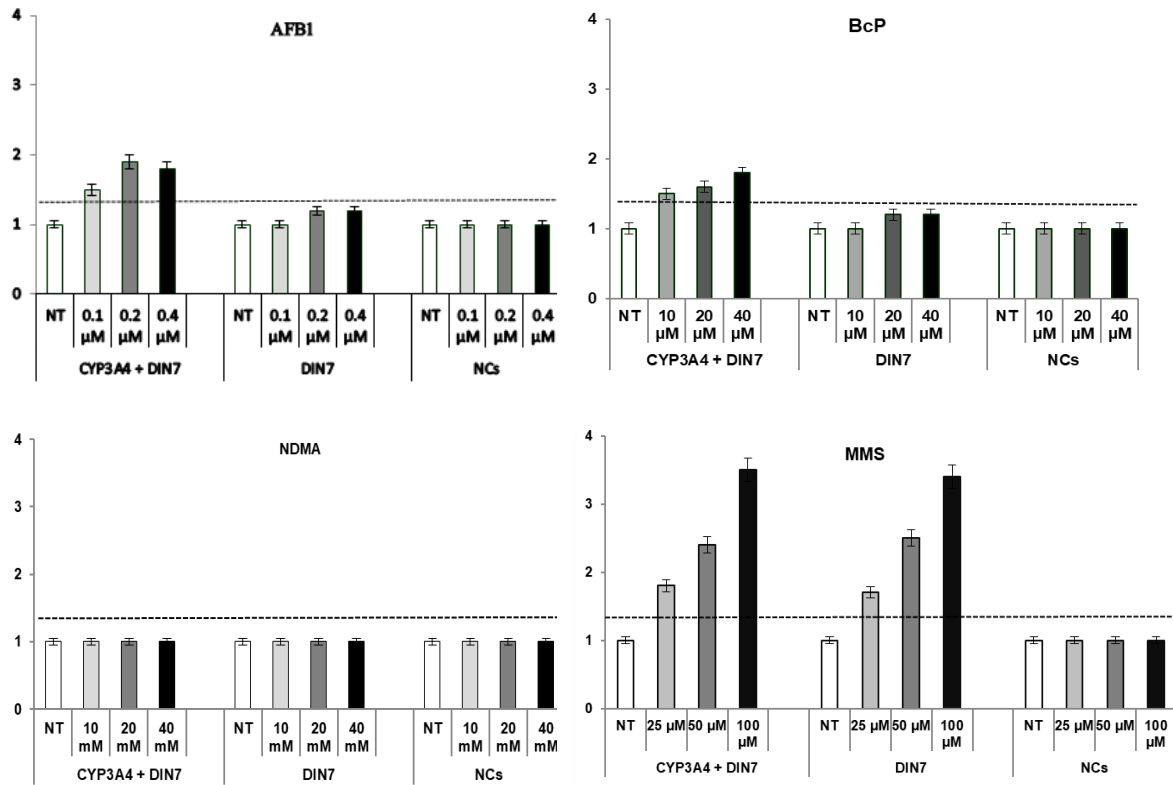
Các chủng mang cấu trúc gen khác nhau được xử lý với dải nồng độ pha loãng nối tiếp của AFB1, B(c)P, NDMA, MMS để xác định và

đánh giá khả năng gây độc gen. Nồng độ các chất khảo sát nằm trong phạm vi tuyến tính với tín hiệu huỳnh quang thu được. Trong nghiên cứu này, tín hiệu huỳnh quang của GFP được biểu thị bằng số lần cảm ứng so với mẫu đối chứng tỷ lệ

thuận và tuyến tính với nồng độ chất được khảo sát (Hình 4). Số lần cảm ứng phụ thuộc hoàn toàn vào các hệ thống mang các cấu trúc gen khác nhau, tính chất hóa học của các hợp chất thử nghiệm cũng như nồng độ của chúng. Dòng tế bào CYP3A4 + DIN7 được đồng biến nạp cả hai phức hợp *CPR-CYP3A4* và *DIN7-GFP* trong hai vector riêng biệt đã tạo ra tín hiệu trên ngưỡng gây độc gen (≥ 1.3 lần) và tỉ lệ thuận khi tăng nồng độ của AFB1, B(c)P và MMS, nhưng không tạo tín hiệu huỳnh quang tại bất kỳ nồng độ nào của NDMA (Hình 4).

Trong khi đó, dòng DIN7 được biến nạp một vector mang *DIN7-GFP* tín hiệu huỳnh quang

chỉ được ghi nhận và tỷ lệ thuận với sự tăng nồng độ của đối chứng dương là MMS (Hình 4), nhưng không tạo ra tín hiệu huỳnh quang khi xử lý với AFB1, B(c)P và NDMA (số lần cảm ứng ≤ 1.3 , dưới ngưỡng gây độc gen) ở tất cả các nồng độ xử lý (Hình 4). Ngược lại, hệ thống chỉ chứa hai vector trống (ĐC âm, NC) không tạo ra tín hiệu ở bất kỳ nồng độ nào đối với cả bốn hợp chất thử nghiệm (Hình 4 và Bảng 1). Như vậy, chỉ có hệ thống mang cả hai cấu trúc biểu hiện *CPR-CYP* và *DIN7-GFP* mới có thể xác định cả chất gây đột biến gen, ung thư và tiền ung thư, trong khi đó các hệ thống có cấu trúc *DIN7-GFP* chỉ có thể phát hiện ra chất gây đột biến gen (MMS).



Hình 4. Cảm ứng huỳnh quang trong các dòng tế bào nấm men mang các cấu trúc gen khác nhau khi xử lý bởi các hợp chất ung thư và tiền ung thư. NT: Đối chứng âm, không xử lý hóa chất; CYP3A4 + DIN7: Hệ thống mang cả cấu trúc CPR-CYP3A4 và DIN7-GFP; DIN7: Hệ thống chỉ mang cấu trúc DIN7-GFP; Hệ thống NCs (kiểm chứng âm): Dòng tái tổ hợp với hai plasmid pESC-URA và pUMGP5 rỗng; Đường gạch đứt (---) là ngưỡng của số lần cảm ứng GFP có giá trị 1,3

Có thể thấy rằng CYP3A4 chuyển hóa các chất, AFB1, BcP thành một số sản phẩm trong đó có cả chất chuyển hóa có khả năng gây đột biến gen, AFB1-exo-8-epoxide (Yamazaki H *et al.*, 1995), hợp chất này phản ứng với DNA ở vị trí N7 của guanine để tạo thành cấu trúc AFB1-N7-Gua và tạo ra sự chuyển đổi nucleotit G thành T (Donato MT *et al.*, 2004). Như vậy, sự tạo thành AFB1-exo-8-epoxide đã kích hoạt promoter DIN7 dẫn đến quá trình phiên mã và biểu hiện GFP, tín hiệu huỳnh quang được xác nhận (Hình 4 và Bảng 1). Tương tự như vậy, CYP3A4 đã được hoạt hóa

sinh học B(c)P thành đồng phân lập thể diol epoxide có khả năng xen cài vào chuỗi xoắn DNA hoặc liên kết cộng hóa trị với DNA (Wild CP *et al.*, 2002). Diol epoxide này liên kết cộng hóa trị với DNA ở vị trí N7 của guanine, (Yun CH *et al.*, 1992) do đó kích thích promoter DIN7 và biểu hiện GFP (Hình 4 và Bảng 1). Trong khi CYP3A4 không chuyển hóa NDMA thành các sản phẩm chuyển hóa gây đột biến gen, do đó promoter DIN7 không được cảm ứng hoạt động và dẫn đến tín hiệu huỳnh quang không được ghi nhận ở chủng đồng biểu hiện CPR-CYP3A4.

Bảng 1. Cảm ứng huỳnh quang trong các dòng tế bào nấm men mang các cấu trúc gen khác nhau khi xử lý bởi các tác nhân gây tổn thương DNA.

Hợp chất thử nghiệm	Nồng độ	CYP3A4 + DIN7	DIN7	NCs
Aflatoxin B ₁	NT	-	-	-
	0,1 µM	+	-	-
	0,2 µM	+	-	-
	0,4 µM	++	-	-
Benzo(c)phenanthrene	NT	-	-	-
	10 µM	+	-	-
	20 µM	+	-	-
	40 µM	+	-	-
N-Nitrosodimethylamine	NT	-	-	-
	10 mM	-	-	-
	20 mM	-	-	-
	40 mM	-	-	-
Methyl methanesulfonate	NT	-	-	-
	25 µM	+	+	-
	50 µM	++	++	-
	100 µM	+++	+++	-

Trong đó: Số lần huỳnh quang của mẫu <= 1.3 là không gây độc; +(1,3, 2]; ++ (2,3]; +++ (3,4]; ++++ (4,5]; +++++ (5, ∞]

KẾT LUẬN

Protein tái tổ hợp CPR-CYP3A4 đều được biểu hiện tốt ở chủng đồng biến nạp cả hai vector riêng rẽ (DIN7-GFP-pUMGP5 và CPR-CYP3A4-pESC). Khối lượng phân tử của CPR và CYP3A4 tái tổ hợp lần lượt là 75 kDa và 56 kDa. Enzyme CYP3A4 chỉ thể hiện hoạt tính

chuyển hoá khi được biểu hiện cùng với CPR. Các hằng số động học K_m , V_{max} , V_{max}/K_m của phức hệ enzyme CPR-CYP3A4 lần lượt tương ứng là 3,2 µM, 3,5 pmol/pmol CYP/min, 1,1 µL/pmol CYP/min.

Biosensor được tạo ra khi đồng biểu hiện cả hai phức hệ *CPR-CYP3A4* và *DIN7-GFP* trong

tế bào *Saccharomyces cerevisiae* (Y486) đã xác định được aflatoxin B1 trong khoảng 0,1–0,4 μ M và benzo(c)phenanthrene trong khoảng 10 - 40 μ M. Tuy nhiên, biosensor này không phát hiện được sự có mặt của các hợp chất tiền ung thư như, *N*-Nitrosodimethylamine ở tất cả các nồng độ khảo sát. Đây là kết quả bước đầu cho việc tiếp tục phát triển các dạng biosensor để xác định nhiều hợp chất tiền ung thư khác trong tự nhiên thông qua việc thiết kế lại hệ thống biểu hiện bằng cách thay thế các CYP450 khác ở người như CYP1A1, CYP2B6, CYP2C9... và promoter cảm ứng đặc hiệu khác nhau như POL30, PLM2, THI4... Bởi lẽ, theo nhiều tài liệu công bố, các CYP450 này cũng tham gia quá trình chuyển hoá một số hợp chất vô hại thành hợp chất độc hại gây ung thư, bên cạnh vai trò khử độc trong cơ thể của chúng.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi kinh phí từ đề tài khoa học công nghệ cấp đại học của Trường Đại học Khoa học Thái Nguyên mã số ĐH2015-TN06-04

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Afanassiev, Victor, Mark Sefton, Thaddao A, Gordon B, Richard W, and Stefan W (2000) Application of Yeast Cells Transformed with GFP Expression Constructs Containing the RAD54 or RNR2 Promoter as a Test for the Genotoxic Potential of Chemical Substances. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 464(2): 297–308.

Bonowski F, Kitanovic A, Ruoff P, Holzwarth J, Kitanovic I, Bui VN, Lederer E, Wolfl S (2010) Computer controlled automated assay for comprehensive studies of enzyme kinetic parameters. *PLoS One* 5(5).

Bui VN, Nguyen TTH, Bettarel Y, Nguyen HTT, Pham TL, Hoang TY, Nguyen VTT, Wöfl S (2015) Genotoxicity of Chemical Compounds Identification and Assessment by Yeast Cells Transformed with GFP Reporter Constructs Regulated by the PLM2 or DIN7 Promoter. *Inter J Toxicol* 34 (1): 31–43.

Bui VN, Nguyen TT, Mai CT, Bettarel Y, Hoang TY, Trinh TT, Truong NH, Chu HH, Nguyen VT, Nguyen HD, Wolfl S (2016) Procarcinogens - Determination and Evaluation by Yeast-Based Biosensor Transformed with Plasmids Incorporating RAD54

Reporter Construct and Cytochrome P450 Genes. *PLoS One* 11(12)

Cahill, P A, A W Knight, N Billinton, M G Barker, L Walsh, P O Keenan, C V Williams, D J Tweats, and R M Walmsley (2004). The GreenScreen Genotoxicity Assay: A Screening Validation Programme. *Mutagenesis* 19(2): 105–19.

Danielson PB (2002). The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans. *Current Drug Metabolism* 3(6): 561–97.

Dietrich M, Grundmann L, Kurr K, Valinotto L, Saussele T, Schmid RD, Lange S (2005). Recombinant production of human microsomal cytochrome P450 2D6 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Chembiochem* 6(11): 2014–2022.

Donato MT, Jimenez N, Castell JV, Gomez-Lechon MJ (2004). Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* 32(7): 699–706

Gietz, R Daniel, and Robert H Schiestl (2007). High-Efficiency Yeast Transformation Using the LiAc/SS Carrier DNA/PEG Method. *Nature Protocols* 2(1): 31–34.

Gu, Man Bock, Robert J Mitchell, and Byoung Chan Kim (2004) Whole-Cell-Based Biosensors for Environmental Biomonitoring and Application. *Adv Biochem Engineer/Biotechnol* 87: 269–305.

Guengerich FP (2008) Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol* 21(1): 70–83.

Guengerich, F Peter, Martha V Martin, Christal D Sohl, and Qian Cheng (2009).

Gundinc, U. A. Filazi (2009) Detection of aflatoxin M1 concentrations in UHT milk consumed in Turkey markets by ELISA. *Pak J Biol Sci* 12(8): 653-6.

Measurement of Cytochrome P450 and NADPH–Cytochrome P450 Reductase. *Nature Protocols* 4 (9): 1245–51.

Irigaray P, Belpomme D (2010) Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. *Carcinogenesis*.

Luckert C, Ehlers A, Buhrke T, Seidel A, Lampen A, Hessel S (2013) Polycyclic aromatic hydrocarbons stimulate human CYP3A4 promoter activity via PXR. *Toxicol Lett* 222(2): 180–8

- McCoy, Henrika, J. Curtis McMillen, and Edward L. Spitznagel (2008). Older Youth Leaving the Foster Care System: Who, What, When, Where, and Why? *Children and Youth Services Review* 30(7): 735–45.
- Petranovic, Dina, Keith Tyo, Goutham N Vemuri, and Jens Nielsen (2010). Prospects of Yeast Systems Biology for Human Health: Integrating Lipid, Protein and Energy Metabolism.” *FEMS Yeast Research* 10(8): 1046–59.
- Raghevendran, V, K R Patil, L Olsson, J Nielsen (2006). Hap4 Is Not Essential for Activation of Respiration at Low Specific Growth Rates in *Saccharomyces Cerevisiae*. *J Bio Chem* 281: 18.
- Rodríguez Velasco, M L, M M Calonge Delso, and D Ordóñez Escudero (2003). ELISA and HPLC Determination of the Occurrence of Aflatoxin M (1) in Raw Cow’s Milk. *Food Additives and Contaminants* 20(3): 276–80.
- Sapsford, Kim E, Chris R Taitt, Stephanie Fertig, Martin H Moore, Michael E Lassman, Chris M Maragos, and Lisa C Shriver-Lake (2006). Indirect Competitive Immunoassay for Detection of Aflatoxin B1 in Corn and Nut Products Using the Array Biosensor. *Biosensors & Bioelectronics* 21(12): 2298–2305.
- Siddens, Lisbeth K, Andrew Larkin, Sharon K Krueger, Christopher A Bradfield, Katrina M Waters, Susan C Tilton, Cliff B Pereira, et al., (2012). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons as Skin Carcinogens: Comparison of Benzo[a]Pyrene, Dibenz[a,h]Chrysene and Three Environmental Mixtures in the FVB/N Mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology* 264(3): 377–86.
- Wada, Ken-Ichi, Akiyoshi Taniguchi, Jun Kobayashi, Masayuki Yamato, and Teruo Okano (2008). Live Cells-Based Cytotoxic Sensorchip Fabricated in a Microfluidic System. *Biotechnology and Bioengineering* 99 (6): 1513–17.
- Walsh L, Hastwell PW, Keenan PO, et al. (2005). Modification and variations in solvent increase the sensitivity of the yeast RAD54-GFP genotoxicity assay. *Mutagenesis*. 20(5): 317–27.
- Wild CP, Turner PC (2002). The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis* 17(6): 471–81.
- Yamazaki H, Inui Y, Wrighton SA, Guengerich FP, Shimada T (1995). Procarcinogen activation by cytochrome P450 3A4 and 3A5 expressed in *Escherichia coli* and by human liver microsomes. *Carcinogenesis* 16(9): 2167–70
- Yao R, Zhang Z, An X, Bucci B, Perlstein DL, et al., (2003). Subcellular localization of yeast ribonucleotide reductase regulated by the DNA replication and damage checkpoint pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 6628-33
- Yun CH, Shimada T, Guengerich FP (1992). Roles of human liver cytochrome P4502C and 3A enzymes in the 3-hydroxylation of benzo(a)pyrene. *Cancer Res*. 52(7): 1868–74.

DEVELOPMENT OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Y486-BASED BIOSENSOR CARRYING BOTH *CPR-CYP3A4* AND *DIN7-GFP* CONSTRUCTS FOR MUTAGENICITY TESTING OF PROCARCINOGENS

Nguyen Thị Thu Huyen¹, Bui Van Ngoc^{2,3}

¹*Thai Nguyen University of Sciences*

²*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

³*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

In the world and Vietnam, a great number of toxic substances from industrial and agricultural activities, food production, and healthcare services are daily released into the environment. Many exogenous harmful substances are procarcinogens, but become carcinogens by the bioactivation of human cytochrome P450 enzymes (CYPs). Thus, development of analytical testing for rapid detection of procarcinogens plays a crucial role in food safety and environmental monitoring. This

study aims to establish a biosensor basing on *Saccharomyces cerevisiae* Y486 cotransformed with two promoter–gene constructs, *CYP3A4–CPR* and *DIN7–GFP*. The results showed that all recombinant proteins were coexpressed in Y486 cells. The molecular weight of recombinant CPR and CYP3A4 were 75 kDa and 56 kDa, respectively. CYP3A4 enzyme only showed its catalytic activity in biotransformation of the specific substance as coexpressed with CPR. Kinetic constants, K_m , V_{max} , and V_{max}/K_m , of this CPR–CYP3A4 enzyme complex were 3.2 μM , 3.5 pmol/pmol CYP/min, and 1.1 $\mu\text{L}/\text{pmol CYP}/\text{min}$, respectively. Coexpressing constructs of CPR–CYP3A4 and DIN7-GFP in Y486 strain was able to identify aflatoxin B1 in the range of 0.1 - 0.4 μM ; benzo(c)pyrene in the range of 10 - 40 μM . However, this system could not detect other procacinogens, such as, *N*-Nitrosodimethylamine, at any investigated concentrations. These findings were the first trial for further development of other biosensors to determine diverse procarcinogens in the enviroment by redesign of coexpressing constructs or replacement of the specific CYPs and inducible promoters.

Keywords: cytochrome P450 monooxygenase, CYP3A4, coexpression, enzyme kinetic constants, NADPH cytochrome P450 reductase