

NGHIÊN CỨU ĐÁP ỨNG VỚI ĐIỀU KIỆN OXY HÓA BẤT LỢI Ở VI KHUẨN *STREPTOCOCCUS MUTANS*

Nguyễn Thị Thịnh, Nguyễn Thị Mai Phương

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm tìm hiểu sự đáp ứng của vi khuẩn *Streptococcus mutans*, tác nhân chính gây sâu răng ở người, với các chất gây tổn thương oxy hóa khác nhau gồm H_2O_2 , 8 hydroxyquinoline - 8HQ (làm tăng sinh gốc H_2O_2 và O_2^-), và plumbagin (làm tăng sinh gốc O_2^-). Những sự thay đổi về hoạt tính các enzyme bảo vệ gồm superoxide dismutase (SOD), NADH oxidase (NOX), glutathione reductase (GR) và thành phần protein của vi khuẩn dưới điều kiện oxy hóa bất lợi gây ra bởi các chất kháng khuẩn này đã được kiểm tra. Điều kiện oxy hóa bất lợi làm tăng hoạt tính SOD tới 134, 113 và 240% so với đối chứng, tương ứng với các nồng độ xử lý tế bào là 0,5 mM H_2O_2 , 21 μ M 8HQ và 10 μ M plumbagin. Mức độ peroxide hóa tế bào thông qua việc đo hàm lượng malonaldehyde - MDA cũng tăng lên khi tăng nồng độ các chất xử lý. Tương tự, hàm lượng glutathione - GSH, đặc biệt là plumbagin cũng tăng lên đáng kể khi tế bào được xử lý với các chất kháng khuẩn này. Ngoài ra, chúng tôi cũng tìm thấy sự khác biệt về mức độ biểu hiện của các băng điện di hoạt tính enzyme SOD, NOX và GR của *S. mutans* ở các mẫu đối chứng so với mẫu xử lý, đặc biệt là các mẫu xử lý với H_2O_2 . Thành phần protein của tế bào trên điện di đồ SDS-PAGE đã thấy xuất hiện những băng protein được cảm ứng (màu đậm hơn), băng protein bị ức chế (màu nhạt hơn) và những băng protein mới xuất hiện so với mẫu đối chứng. Rõ ràng là đã có sự thay đổi sâu sắc trong quá trình sinh tổng hợp protein của vi khuẩn *S. mutans* để thích nghi với các điều kiện oxy hóa bất lợi. Các kết quả nghiên cứu của chúng tôi gợi ý rằng sự tăng hoạt tính SOD và hàm lượng GSH có thể là những đáp ứng điều kiện bất lợi nói chung của *S. mutans* với các điều kiện oxy hóa bất lợi. Các băng protein mới phát hiện cũng có thể sẽ là những biomarker để nghiên cứu về điều kiện oxy hóa bất lợi ở vi khuẩn nói chung.

Từ khóa: Điều kiện oxy hóa bất lợi, H_2O_2 , plumbagin, *Streptococcus mutans*, 8-hydroxyquinoline

MỞ ĐẦU

Các vi khuẩn trong mảng bám răng thường xuyên tiếp xúc với các gốc oxy phản ứng (reactive oxygen species - ROS) sinh ra trong quá trình trao đổi chất hay có mặt trong các sản phẩm vệ sinh răng miệng. ROS gây ra những tổn thương oxy hóa cho tế bào, là quá trình có tính chất chìa khóa gây ảnh hưởng đến các hoạt động của vi khuẩn trong mảng bám răng. Nhằm duy trì sự cân bằng thể oxy hóa và bảo vệ các cấu trúc của tế bào, cơ thể sinh vật đã phát triển một hệ thống những enzyme có chức năng phân hủy hay loại bỏ ROS. Các enzyme chủ yếu bao gồm superoxide dismutase (SOD), oxidase, peroxidase (POD), glutathione reductase (GR) và catalase (CAT). Trong số các enzyme này thì SOD được xem là enzyme quan trọng nhất vì nó triệt tiêu O_2^- , là một ROS được sinh ra thường xuyên ở các sinh vật hiếu khí (Farr, Kogoma, 1991). Các vi khuẩn thuộc giống *Streptococcus* không có khả năng tổng hợp nhân hem nên không có hệ thống oxy hóa

phosphoryl hóa nhưng vẫn có khả năng hô hấp cao. Ở những chủng gây bệnh đường miệng như là *S. mutans* GS-5 hay *S. sobrinus*, sự tiêu thụ oxy liên quan chủ yếu đến hệ thống NADH oxidase (NOX). Nhờ NOX, quá trình khử đơn trị oxy được hạn chế, qua đó hạn chế được sự hình thành ROS. Chính vì vậy enzyme này cùng với SOD và GR được xem là có vai trò chống tổn thương oxy hóa chủ yếu ở vi khuẩn này (Pool, Claiborne, 1986).

Ngoài hệ thống bảo vệ bằng enzyme, phần lớn tế bào còn sử dụng các protein chống oxy hóa không phải enzyme có khối lượng phân tử thấp. Các chất bảo vệ điển hình theo kiểu này có glutathione (GSH), một tripeptide gồm Glu-Cys-Gly. GSH có thể phản ứng trực tiếp với các phân tử oxi singlet, superoxide và gốc hydroxyl tự do, vì vậy có vai trò trực tiếp như chất săn lùng gốc tự do. Một chức năng quan trọng khác của GSH là khử cầu disulfide, hình thành khi có điều kiện oxy hóa bất lợi ở protein (Beutler *et al.*, 1963).

Bài báo này trình bày những kết quả nghiên cứu về đáp ứng với điều kiện oxy hóa bất lợi ở vi khuẩn *Streptococcus mutans* khi được xử lý với một số chất kháng khuẩn có khả năng gây tổn thương oxy hóa gồm: i) H_2O_2 ; ii) 8-hydroxyquinoline (8HQ); và iii) plumbagin, là chất có khả năng kích thích sự sinh gốc O_2^- . Mục đích của nghiên cứu là nhằm tìm hiểu bức tranh chung về quá trình tổn thương oxy hóa ở vi khuẩn trong mảng bám răng, mà trước hết là ở *Streptococcus*, và qua đó xác định các cơ chế bảo vệ chủ yếu của vi khuẩn, giúp tìm ra những biện pháp hiệu quả hơn để kiểm soát các bệnh truyền nhiễm trong xoang miệng, đặc biệt là sâu răng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng vi sinh vật

Chủng vi khuẩn *Streptococcus mutans* GS-5 được lấy từ bộ sưu tập giống của phòng thí nghiệm do GS. Robert E. Marquis, Đại học Rochester, New York, Hoa Kỳ cung cấp. Tế bào được nuôi cấy ở 37°C trong môi trường chứa 3% tryptone, 0,5% dịch chiết nấm men và 1% glucose (TYG) đến đầu pha sinh trưởng log ($OD_{A700} \approx 0,35$) thì được xử lý với chất nghiên cứu ở những nồng độ thích hợp. Sau khi phát triển qua một thế hệ ($OD_{700} \approx 0,7$), tế bào được thu hoạch và thu dịch chiết theo quy trình như Svensater và đồng tác giả đã mô tả trước đây (*et al.*, 2000).

Phương pháp

Xác định hoạt độ enzyme

Hoạt độ NOX được xác định theo phương pháp của Pool và Claiborne (2000). Hoạt độ GR được xác định theo phương pháp của Carlberg và Mannervik (1985). Hoạt độ SOD được xác định theo phương pháp của McCord và Fridovich (1969).

Xác định sự peroxide hóa lipid

Sự peroxide hóa lipid được đánh giá thông qua sản phẩm tạo thành của quá trình này là malonaldehyde (MDA). Hàm lượng MDA được xác định theo phương pháp của Wasowicz và đồng tác giả (1993).

Xác định hàm lượng glutathione (GSH)

Nồng độ GSH được xác định theo phương pháp của Beutler và đồng tác giả (1963). Sản phẩm tạo thành là thionitrobenzene được đo trên máy quang

phổ tại bước sóng 412 nm.

Xác định hàm lượng protein

Protein được xác định bằng phương pháp của Lowry và đồng tác giả (1951), sử dụng albumin huyết thanh bò (BSA) làm chất chuẩn.

Điện di protein

Điện di protein trên gel polyacrylamide (PAGE) theo phương pháp của Laemmli (1970). Băng SOD trên gel điện di không biến tính PAGE được xác định theo phương pháp của Beuchamp và Fridovich (1971). Băng NOX được xác định theo phương pháp của David và đồng tác giả (2001) và băng GR được xác định theo phương pháp của Hou và đồng tác giả (2004).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

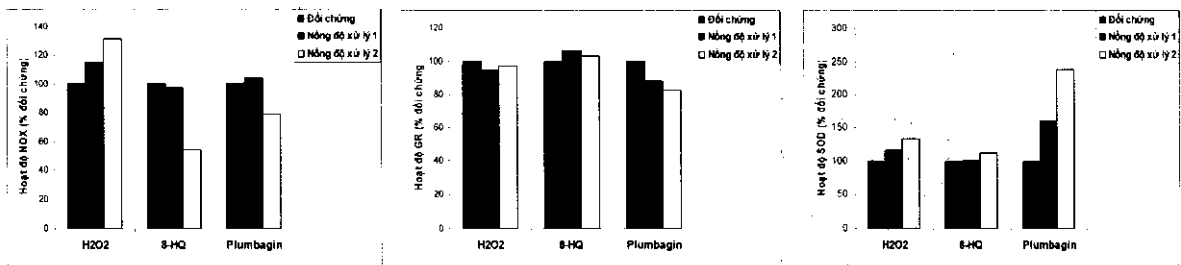
Ảnh hưởng của điều kiện oxy hóa bất lợi do H_2O_2 , 8HQ và plumbagin lên sự peroxide hóa lipid và hàm lượng GSH của vi khuẩn *S. mutans*

Một trong những sản phẩm của sự peroxide hóa lipid là malonaldehyde (MDA), vì thế việc đánh giá ảnh hưởng của các chất quan tâm lên quá trình này được thực hiện thông qua việc xác định hàm lượng MDA trong các mẫu nghiên cứu. Số liệu thu được ở bảng 1 cho thấy hàm lượng chất này ở các mẫu được xử lý đều cao hơn so với mẫu đối chứng và dường như có xu hướng tăng lên khi tăng nồng độ xử lý. Cụ thể là, ở các mẫu tế bào xử lý với H_2O_2 0,5 mM, 8HQ 21 μ M và plumbagin 10 μ M, đều có hàm lượng MDA cao hơn rõ rệt so với các mẫu H_2O_2 0,25 mM, 8HQ 10,5 μ M và plumbagin 5,0 μ M. Đặc biệt, ở mẫu xử lý với 8HQ 21 μ M, hàm lượng MDA tăng lên tới 194% so với đối chứng, đạt 24,49 nmol/mg protein so với 12,46 nmol/mg. Điều đó chứng tỏ chất này có khả năng gây peroxide hóa lipid mạnh.

Sự tích lũy chất chống oxy hóa GSH trong tế bào sau khi xử lý các chất kháng khuẩn cũng đã được kiểm tra để xem xét đáp ứng bảo vệ của tế bào đối với các chất nghiên cứu (Bảng 1). Kết quả thu được cho thấy trong số 3 chất kháng khuẩn được nghiên cứu thì plumbagin có ảnh hưởng rõ rệt nhất đến chỉ số này. Ở nồng độ xử lý plumbagin 10 μ M, hàm lượng GSH tăng 148% so với mẫu đối chứng, đạt tới 132,10 μ mol/mg protein so với 89,10 μ mol/mg protein. Tuy nhiên, điều thú vị là H_2O_2 được xem là chất oxy hóa khá mạnh, dường như lại không ảnh hưởng đến quá trình này. Nguyên nhân của sự sai khác ở đây có lẽ là do GSH đã phản ứng trực tiếp với O_2^- để triệt tiêu gốc ROS này.

Bảng 1. Hàm lượng MDA và GSH của dịch chiết tế bào *S. mutans* trong điều kiện oxy hóa bất lợi được tạo bởi các chất kháng khuẩn gây tổn thương oxy hóa là H₂O₂, 8HQ và plumbagin.

Chất kháng khuẩn		MDA		GSH	
		(nmol/mg protein)	%	(μmol/mg protein)	%
H ₂ O ₂	Đối chứng	12,46	100	111,33	100
	0,25 mM	12,63	101	116,34	105
	0,50 mM	13,91	112	108,02	97
8HQ	Đối chứng	11,62	100	78,42	100
	10,50 μM	14,49	125	77,80	99
	21,00 μM	24,49	194	91,50	117
Plumbagin	Đối chứng	12,98	100	89,10	100
	5,00 μM	13,05	100	92,31	104
	10,00 μM	13,62	105	132,10	148



Hình 1. Hoạt độ các enzyme chống tổn thương oxy hóa NOX (A), GR (B), SOD (C) của vi khuẩn *S. mutans* khi xử lý với H₂O₂ (0,25 mM và 0,5 mM); 8HQ (10,5 và 21 μM); plumbagin (5 μM và 10 μM).

Điều kiện oxy hóa bất lợi và hoạt tính các enzyme bảo vệ SOD, NOX và GR

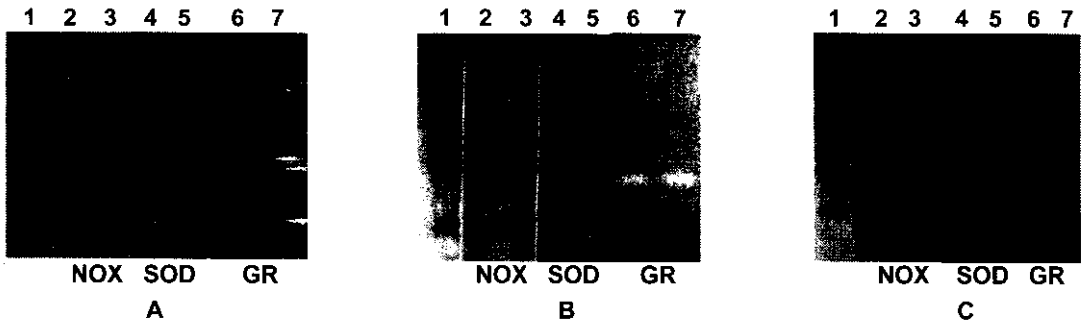
Kết quả nghiên cứu về hoạt độ các enzyme bảo vệ SOD, NOX và GR của *S. mutans* trong điều kiện bị oxy hóa bất lợi khi xử lý với các chất H₂O₂, 8HQ và plumbagin được trình bày ở hình 1A, B, C.

Số liệu thu được cho thấy có sự thay đổi về hoạt độ của các enzyme này. Một điều dễ nhận thấy ở đây là plumbagin và 8HQ có cùng một xu hướng ảnh hưởng làm tăng hay giảm hoạt độ các enzyme trong khi đó H₂O₂ có vẻ như đã làm tăng hoạt độ của cả 3 enzyme này. Kết quả này rất phù hợp với phát hiện của một số tác giả trước đây khi nghiên cứu về đáp ứng điều kiện oxy hóa bất lợi do H₂O₂ ở *E. coli* (Svensater *et al.*, 2000). Đối với NOX, H₂O₂ làm tăng hoạt độ của enzyme còn plumbagin và đặc biệt là 8HQ lại làm giảm đáng kể hoạt độ của nó. Đối với GR, chỉ có plumbagin làm giảm hoạt độ enzyme trong khi hai chất kháng khuẩn còn lại là

H₂O₂, 8HQ lại hầu như không có ảnh hưởng. Điều đặc biệt là hoạt độ của SOD, enzyme chìa khóa của quá trình chống tổn thương oxy hóa, đều tăng mạnh khi xử lý tế bào với tất cả các chất kháng khuẩn trên. Cụ thể là, khi xử lý với H₂O₂, 8HQ và plumbagin ở các nồng độ 0,5 mM, 10 μM và 21 μM, theo thứ tự, thì hoạt độ của enzyme này tăng lần lượt là 134, 113 và 240% so với đối chứng. Việc tăng mạnh hoạt độ enzyme SOD khi xử lý tế bào với plumbagin có thể lý giải là do plumbagin là chất có khả năng làm tăng sinh gốc O₂⁻, cơ chất trực tiếp của enzyme SOD. 8HQ cũng là chất gây tổn thương oxy hóa tế bào thông qua việc làm tăng sinh gốc O₂⁻ và H₂O₂ nên có lẽ vì thế cũng làm tăng hoạt độ SOD mặc dù không nhiều như plumbagin. Như vậy, sự tăng hoạt tính SOD trong thí nghiệm này có lẽ là một đáp ứng chung khi cơ thể sinh vật bị điều kiện oxy hóa bất lợi và có vai trò quan trọng giúp các sinh vật sống sót trong điều kiện bị điều kiện bất lợi. Ảnh điện di các băng SOD, NOX và GR (Hình 2A,

B, C) ở các mẫu tế bào xử lý với H_2O_2 dường như đều đậm hơn so với đối chứng. Trong khi đó, ở mẫu tế bào xử lý 8HQ và plumbagin không thể hiện rõ sự khác biệt này. Sự biểu hiện các băng enzyme đậm hơn ở mẫu xử lý chứng tỏ chúng đã được cảm ứng sinh tổng hợp trong điều kiện bất lợi. Sự thay đổi về

số lượng và chất lượng của các enzyme chống tổn thương oxy hóa như SOD, CAT, POD, GR cũng đã được thông báo trong nghiên cứu của El-baky và đồng tác giả (2003) khi các tác giả này nghiên cứu khả năng chống chịu điều kiện muối bất lợi ở các giống hành.



Hình 2. Điện di đồ các enzyme SOD, GR, NOX trên PAGE. **A.** H_2O_2 0,5 mM; **B.** 8HQ 21 μ M; **C.** plumbagin 10 μ M. 1: phổ băng protein tổng số; 2: băng NOX ở mẫu đối chứng; 3: băng NOX ở mẫu xử lý; 4: băng SOD ở mẫu đối chứng; 5: băng SOD ở mẫu xử lý; 6: băng GR ở mẫu đối chứng; 7: băng GR ở mẫu xử lý.

Phổ protein SDS-PAGE của *S. mutans* khi xử lý với các chất gây điều kiện oxy hóa bất lợi khác nhau

Dịch chiết tế bào sau khi xử lý với các chất kháng khuẩn gây tổn thương oxy hóa là H_2O_2 , 8HQ và plumbagin được điện di SDS-PAGE để phát hiện những sai khác trong phổ protein so với đối chứng. Ảnh điện di thu được cho thấy các băng protein dưới đơn vị đã được tách ra (Hình 3 A, B, C).

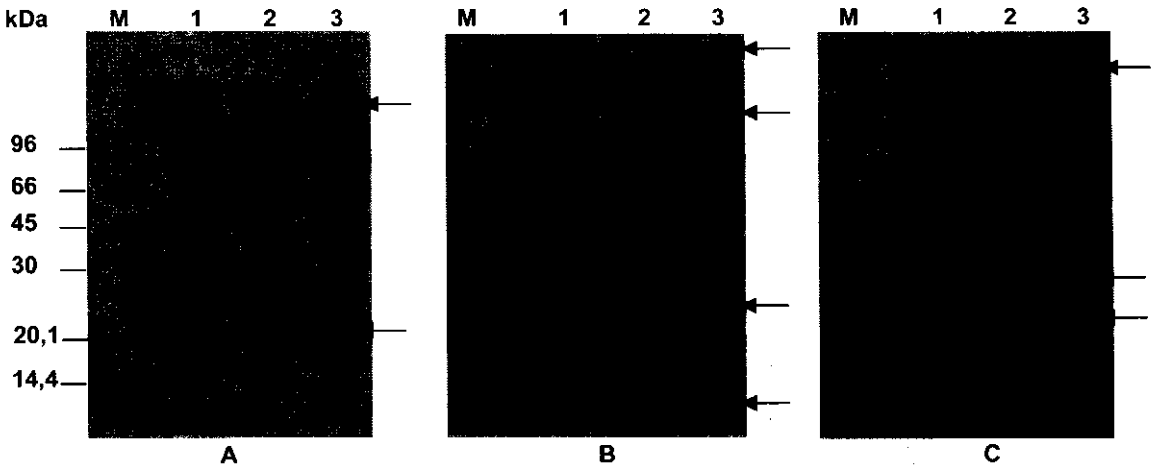
Nhìn chung, các mẫu được nghiên cứu đều có chứa một số băng protein đậm, ví dụ như các băng ở vùng khoảng 88 và 70 kDa. Bên cạnh đó, cũng thấy xuất hiện những băng protein có màu đậm hơn, nhạt hơn và những băng protein mới so với mẫu đối chứng (mũi tên). Cụ thể là, ở mẫu xử lý với 8-HQ thấy xuất hiện 1 băng protein mới tương ứng với khối lượng phân tử khoảng 27 kDa và 1 băng protein nhạt hơn so với đối chứng (Hình 3A). Mẫu xử lý với plumbagin thấy xuất hiện thêm 2 băng protein mới tương ứng với khối lượng phân tử khoảng 14 và 30 kDa và 2 băng protein được cảm ứng nên có màu đậm hơn (Hình 3B). Với mẫu xử lý với H_2O_2 , thấy xuất hiện thêm 1 băng protein mới tương ứng với khối lượng phân tử > 96 kDa và 2 băng protein được cảm ứng (Hình 3C). Sự xuất hiện của những băng protein mới và những băng protein có sự thay đổi về hàm lượng được sinh tổng hợp trong mẫu xử lý gợi ý rằng, điều kiện oxy hóa bất lợi gây cảm ứng các gen

liên quan đến quá trình sinh tổng hợp các protein này và những protein được cảm ứng có vai trò nhất định trong việc đáp ứng lại các điều kiện bất lợi của tế bào. Bằng kỹ thuật SDS-PAGE, El-baky và đồng tác giả (2003) cũng phát hiện thấy những thay đổi đáng kể trong thành phần protein ở các giống hành có khả năng chịu điều kiện muối bất lợi so với đối chứng. Điều đó chứng tỏ các marker hóa sinh có liên quan chặt chẽ đến điều kiện bất lợi nói chung và đây là cách đơn giản để có thể tìm hiểu về điều kiện bất lợi và khả năng chống chịu điều kiện bất lợi ở vi khuẩn.

Far và Kogoma sử dụng kỹ thuật điện di 2D-gel để nghiên cứu điều kiện oxy hóa bất lợi ở 2 vi khuẩn là *E. coli* và *Salmonella typhimurium* đã phát hiện thấy rất nhiều protein khác nhau được cảm ứng (Farr, Kogoma, 1991). Ví dụ như GR và SOD ở *E. coli* khi xử lý với H_2O_2 , alkyl hydroxypoxide ở *E. coli* khi xử lý với các chất khử quay vòng như paraquat hay menadione. Điều kiện bất lợi O_2^- do paraquat và H_2O_2 ở *E. coli* đều cảm ứng sinh tổng hợp khoảng 30 protein và phần lớn trong chúng là khác nhau (Walkup, Kogoma, 1989). Các tác giả cũng thông báo rằng, sự biểu hiện của các protein này được điều hòa về mặt di truyền và phụ thuộc vào nồng độ chất xử lý. Đối với *S. mutans*, các nghiên cứu cho thấy điều kiện oxy hóa bất lợi nói chung làm tăng cường sinh tổng hợp 69 protein trong đó có 15 protein là đặc hiệu riêng cho điều kiện oxy hóa bất lợi và 24 protein là bị giảm sinh tổng hợp khi so sánh

với mẫu đối chứng (Svensater *et al.*, 2000; Tamarit *et al.*, 1998). Các phân tích so sánh về thành phần protein ở hàng loạt đối tượng vi khuẩn khác nhau trong điều kiện bất lợi như *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. subtilis* và *L. lactis*, đưa đến kết luận về sự tồn tại 3 nhóm protein chính gồm: i) nhóm protein xuất hiện trong tất cả các điều kiện bất lợi, ii) nhóm protein chỉ có mặt trong từng điều kiện bất lợi cụ thể; và iii) nhóm protein có mặt trong nhiều hơn một điều kiện

bất lợi nhưng không phải ở tất cả các điều kiện bất lợi (Svensater *et al.*, 2000). Như vậy, các băng protein thay đổi được phát hiện trong thí nghiệm này là protein nào, có bao nhiêu protein đã được cảm ứng và ức chế sinh tổng hợp và có protein nào trùng lặp với những protein được cảm ứng trong các điều kiện bất lợi khác hay không, là vấn đề chúng tôi đang tìm hiểu trong các nghiên cứu tiếp theo với việc sử dụng kỹ thuật 2-D gel và sắc ký khối phổ.



Hình 3. Điện di đồ protein dịch chiết tế bào *S. mutans* trên SDS-PAGE sau khi xử lý với các chất gây điều kiện oxy hóa bất lợi khác nhau. **A:** 8HQ (1: Đối chứng; 2: Xử lý 8-HQ 10.5 μ M; 3: Xử lý 8-HQ 21 μ M); **B:** plumbagin (1: Đối chứng; 2: Xử lý Plumbagin 5 μ M; 3: Xử lý plumbagin 10 μ M); **C:** H_2O_2 (1: Đối chứng; 2: Xử lý H_2O_2 0,25 mM; 3: Xử lý H_2O_2 0,5 mM). Mũi tên chỉ những thành phần protein được cảm ứng, bị ức chế hay mới sinh tổng hợp khi tế bào *S. mutans* chịu điều kiện oxy hóa bất lợi.

KẾT LUẬN

Vi khuẩn *S. mutans* biểu hiện những đáp ứng chung với điều kiện oxy hóa bất lợi gây ra bởi H_2O_2 , 8-hydroxyquinoline và plumbagin thông qua việc làm tăng hoạt tính một số enzyme bảo vệ trong đó có SOD đi kèm với việc tăng hàm lượng GSH và quá trình peroxide hóa lipid.

Các marker hóa sinh liên quan chặt chẽ đến điều kiện oxy hóa bất lợi ở vi khuẩn *S. mutans* và là công cụ đơn giản để tìm hiểu nhanh khả năng chống chịu điều kiện oxy hóa bất lợi ở vi khuẩn này.

Lời cảm ơn: Công trình có sự hỗ trợ kinh phí của Chương trình nghiên cứu cơ bản trong khoa học tự nhiên (Bộ Khoa học và Công nghệ), mã số 6 133 06. Nghiên cứu được thực hiện có sử dụng một số trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và

Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44: 276-287.
- Beutler E, Duron O, Kelly BM (1963) Improved of method for determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 61: 882-888.
- Carlberg I, Mannervik B (1985) Glutathione reductase assay. *Methods Enzymol* 113: 484-490.
- Reed DW, Millstein J, Hartzell PL (2001) H_2O_2 -forming NADH oxidase with diaphorase (cytochrome) activity from *Archaeoglobus fulgidus*. *J Bacteriol* 66: 7007-7016.
- El-baky A, Mohamed, Hanaa H, Amal A, Hussein MM (2003) Influence of salinity on lipid peroxidation,

antioxidant enzymes and electrophoretic patterns of protein and isoenzymes in leaves of some onion cultivars. *Asian J Plant Sci* 2(17-24): 1220-1227.

Farr BS, Kogoma T (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev* 55(4): 561-585.

Hou WC, Liang HJ, Wang CC, Liu DZ (2004) Detection of glutathione reductase after electrophoresis on native or sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 25(17): 2926-2931.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lowry OH, Rousenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

Macarthur DJ, Jacques NA (2003) Proteome analysis of oral pathogens. *J Dent Res* 82(11): 870-876.

McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase: an enzyme function for erythrocuprein (hemocuprein).

J Bio Chem 244: 6049-6055.

Pool LB, Claiborne A (1986) Interactions of pyridine nucleotide with redox form of the flavin-containing NADH peroxidase form from *Streptococcus faecalis*. *J Biol Chem* 261: 14525-14533.

Svensater G, Sjogreen B, Hamilton RI (2000) Stress responses in *Streptococcus mutans* and the induction of general and stress-specific proteins. *J Microbiol* 146: 107-117.

Tamarit J, Cabisco E, Ros J (1998) Identification of the major oxidatively damaged protein in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. *J Biol Chem* 273: 3027-3032.

Walkup BKL, Kogoma T (1989) *Escherichia coli* proteins inducible by oxidative stress mediated by the superoxide radical. *J Bacteriol* 171(3): 1476-1484.

Wasowicz W, Neve J, Peretz A (1993) Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *J Clin Chem* 39(12): 2522-2526.

STUDY ON THE RESPONSE TO OXIDATIVE STRESS IN *STREPTOCOCCUS MUTANS*

Nguyễn Thị Thịnh, Nguyễn Thị Mai Phương*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

This study was carried out to examine the responses of *Streptococcus mutans*, a major etiological agent of dental caries, to oxidative stress caused by oxidative-damaging agents including H₂O₂, 8-hydroxyquinoline (8HQ) and plumbagin. The changes in the activity of protective enzymes: superoxide dismutase (SOD), NADH oxidase (NOX) and glutathione reductase (GR) and protein pattern of *S. mutans* in response to oxidative stress were detected when the cells were submitted to different oxidative stress conditions. The oxidative stress induced significant increase in SOD activities by 134, 113, and 240% compared to that of the control level (100%) when the cells were exposed to H₂O₂, 8HQ and plumbagin at concentrations of 0.5 mM, 21 μM and 10 μM, respectively. The rate of lipid peroxidation was enhanced (as indicated by increasing the malonaldehyde-MDA contents) when the agent concentrations were increased. Also, glutathione level was remarkably higher compared to that of control when the cells treated with the agents especially, plumbagin. Electrophoresis bands of SOD, NOX and GR of *S. mutans* indicated the difference in relative concentrations due to oxidative stress, particularly, H₂O₂-treated samples. The cell protein profile obtained by SDS-PAGE revealed some up-regulated, down-regulated and new proteins. Clearly, the response of the mutans to the oxidative conditions resulted in complex and severe alterations in protein synthesis to further cell survival. Our findings suggest that the increased SOD activity and GSH level could be general stress responses of *S. mutans* to oxidative stress caused by H₂O₂, 8HQ and plumbagin and that, the new protein bands could be used as biomarkers for study the oxidative stress in bacteria.

Keywords: H₂O₂, 8-hydroxyquinoline, plumbagin, *Streptococcus mutans*, oxidative stress

*Author for correspondence: Tel: 84-4-8360853; Fax: 84-4-8363144; E-mail: phuong.nguyen_99@yahoo.com