

DOI:10.22144/ctu.jvn.2020.041

NGHIÊN CỨU TẠO PROTEIN TÍN HIỆU NANOLUCIFERASE: ỨNG DỤNG TẠO CẢM BIẾN SINH HỌC NHẬN DIỆN KHÁNG SINH

Trần Thị Mỹ Duyên* và Trần Thị Tuyết Hoa

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Thị Mỹ Duyên (email: tmduyen@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 29/11/2019

Ngày nhận bài sửa: 07/12/2019

Ngày duyệt đăng: 29/04/2020

Title:

Generating Nanoluciferase reporter protein for development of biosensor detecting antibiotics

Từ khóa:

Cảm biến sinh học, chloramphenicol, erythromycin, hệ thống tổng hợp protein ngoài tế bào, Nanoluciferase, oxytetracycline

Keywords:

Biosensor, cell-free protein synthesis, chloramphenicol, erythromycin, Nanoluciferase, oxytetracycline

ABSTRACT

This study is aimed to in vitro synthesise nanoluciferase (NanoLuc) reporter protein using cell-free protein synthesis system to develop biosensor for antibiotics inhibiting bacterial protein synthesis. The template for protein synthesis was prepared by amplifying and column purifying the DNA fragment coding for NanoLuc. This result indicated that NanoLuc protein was successfully synthesized through its presence on CBB staining SDS page at 21 kDa and be able to emit light when react to Furimazine. The synthesized NanoLuc protein could detect antibiotics inhibiting bacterial protein synthesis via some representatives including oxytetracycline, chloramphenicol and erythromycin. Specificity was also determined. This information gives a good starting point for further studies on development biosensor for antibiotics inhibiting bacterial protein synthesis; however, the effect of other parameters influencing on in vitro NanoLuc protein synthesis needs investigating.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tổng hợp protein tín hiệu nanoluciferase trong điều kiện phòng thí nghiệm (in vitro), sử dụng hệ thống phiên mã dịch mã ngoài tế bào (cell-free synthesis) để ứng dụng tạo cảm biến sinh học nhận diện nhóm kháng sinh ức chế sự tổng hợp protein của vi khuẩn. Mạch mã khuôn cho quá trình tổng hợp protein được chuẩn bị bằng cách khuếch đại và tinh sạch đoạn DNA mã hoá cho protein nanoluciferase (NanoLuc). Kết quả đã xác định protein NanoLuc được tổng hợp thành công thông qua sự hiện diện trên gel SDS page nhuộm CBB với kích thước 21 kDa và có khả năng phát sáng khi tác dụng với cơ chất Furimazine. Khả năng nhận diện nhóm kháng sinh ức chế sự tổng hợp protein của vi khuẩn được xác định thông qua thử nghiệm nhận diện một số kháng sinh đại diện gồm oxytetracycline, chloramphenicol và erythromycin. Tính đặc hiệu của quá trình nhận diện được xác định. Mặc dù cần khảo sát thêm một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp protein NanoLuc trong điều kiện in vitro nhưng kết quả này cũng tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo trong việc tạo ra cảm biến sinh học có khả năng nhận diện nhóm kháng sinh ức chế sự tổng hợp protein của vi khuẩn.

Trích dẫn: Trần Thị Mỹ Duyên và Trần Thị Tuyết Hoa, 2020. Nghiên cứu tạo protein tín hiệu nanoluciferase: Ứng dụng tạo cảm biến sinh học nhận diện kháng sinh. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(2B): 146-151.

1 GIỚI THIỆU

Tình trạng lạm dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản gây ra nhiều vấn đề nghiêm trọng như ô nhiễm nguồn nước, kích thích sự phát triển của các loài vi khuẩn kháng kháng sinh và dư lượng kháng sinh trong sản phẩm thủy sản làm ảnh hưởng tiêu cực đến sức khỏe người tiêu dùng cũng như chất lượng của sản phẩm xuất khẩu. Năm 2015, theo kết quả điều tra về tình hình sử dụng kháng sinh trong ao nuôi thủy sản nước ngọt ở Đồng bằng sông Cửu Long và Đồng bằng sông Hồng, có 10 loại kháng sinh khác nhau được sử dụng trong đó 3 loại được sử dụng phổ biến nhất là trimethoprim (30,8%), oxytetracycline (30,9%) và sulfamethoxazole (41,5%) (Pham *et al.*, 2015). Nghiên cứu của Hoa *et al.* (2011) cho thấy hàm lượng kháng sinh trong môi trường nước càng cao thì tần số xuất hiện vi khuẩn kháng kháng sinh càng nhiều, ví dụ như hàm lượng sulfamethoxazole được xác định từ 0,47 – 6,66 µg/l thì tần suất xuất hiện của vi khuẩn kháng sulfamethoxazole từ 2,14 – 94,4 %; trong khi đó hàm lượng erythromycin được xác định từ 0,15 – 2,24 µg/l, thì tần suất xuất hiện của vi khuẩn kháng erythromycin thấp hơn, từ 0,01 – 38,8%.

Hiện nay, việc phát hiện kháng sinh trong môi trường nuôi trồng thủy sản cũng như dư lượng kháng sinh trong sản phẩm thủy sản được xác định bằng các phương pháp truyền thống như sắc ký lỏng cao áp (HPLC) hay sắc ký khối phổ (GC-MS) (Phu *et al.*, 2015; Suzuki and Hoa, 2012; Uchida *et al.*, 2016). Tuy nhiên, các phương pháp này cần được thực hiện tại các phòng thí nghiệm có đầy đủ trang thiết bị hiện đại, cán bộ có trình độ để thực hiện qui trình phân tích phức tạp, mất nhiều thời gian, và chi phí cao. Điều đó hạn chế khả năng sử dụng các phương pháp này như một phương pháp sàng lọc, phân tích nhanh một lượng mẫu lớn với chi phí giới hạn.

Cảm biến sinh học được xem là một phương pháp tiềm năng để thay thế các phương pháp phân tích truyền thống, các nghiên cứu về cảm biến sinh học ở Việt Nam vẫn còn nhiều hạn chế. Nhằm phát triển cảm biến sinh học phát hiện một số kháng sinh được sử dụng phổ biến trong nuôi trồng thủy sản như nhóm kháng sinh ức chế sự tổng hợp protein của vi khuẩn như nhóm aminoglycosides, tetracyclines, chloramphenicol và macrolides trong môi trường nước cũng như trong sản phẩm thủy sản với chi phí thấp, thời gian phân tích nhanh, quá trình phân tích đơn giản, ít phụ thuộc vào những thiết bị hiện đại như các phương pháp truyền thống, nghiên cứu “*Tạo protein tín hiệu nanoluciferase (NanoLuc) ứng dụng phát triển cảm biến sinh học nhận diện*

nhóm kháng sinh ức chế sự tổng hợp protein của vi khuẩn” được thực hiện nhằm tạo tiền đề cho các nghiên cứu kế tiếp trong việc phát triển cảm biến sinh học nhận diện nhóm kháng sinh ức chế sự tổng hợp protein của vi khuẩn.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Plasmid pET21a-NLuc mang gen mã hoá protein NanoLuc được cung cấp bởi PGS. Hideyuki Matsuura, Đại học Osaka, Nhật Bản.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

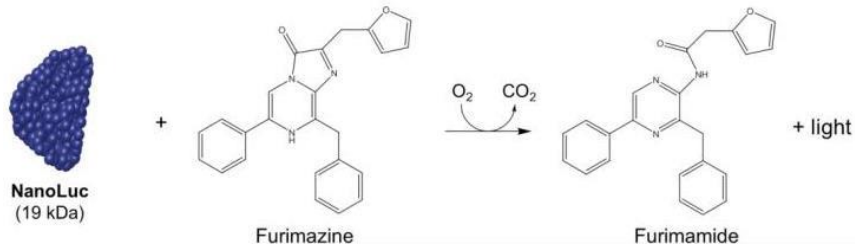
2.2.1 Chuẩn bị DNA khuôn cho quá trình biểu hiện protein NanoLuc trong hệ thống cell-free system

Nghiên cứu thử nghiệm qui trình PCR sử dụng đoạn môi T7 promoter 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' và T7 terminator 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3' để khuếch đại gen mã hoá protein NanoLuc. Thành phần hóa chất cho một phản ứng PCR bao gồm: 1X PCR buffer; 2 mM MgCl₂; 200 µM dNTPs; 0,2 µM môi T7 promoter; 0,2 µM môi T7 terminator; 2,5U Taq polymerase; 10 ng mẫu plasmid pET21a-NLuc. Phản ứng PCR được thực hiện với chu kỳ nhiệt: biến tính ở 95°C trong 5 phút; lặp lại 30 chu kỳ cho 95°C trong 30 giây, 55°C trong 30 giây và 72°C trong 60 giây; giai đoạn kéo dài ở 72°C trong 5 phút. Sản phẩm khuếch đại là đoạn DNA gồm vị trí gắn ribosome (ribosome binding site), gen mã hoá protein NanoLuc hoạt động dưới sự điều khiển của promoter T7 và trình tự của terminator T7. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1% nhuộm bằng ethidium bromide trong dung dịch TAE 0,5X. Sau đó tiến hành tinh sạch sản phẩm PCR bằng kit (Wizard SV gel and PCR clean up system, Promega, Mỹ). Sản phẩm PCR đã tinh sạch được dùng làm mạch mã khuôn cho quá trình biểu hiện protein NanoLuc trong điều kiện *in vitro*.

2.2.2 Phương pháp tổng hợp protein tín hiệu NLuc trong điều kiện *in vitro* (*in vitro* transcription translation system – IVTT)

Thử nghiệm tổng hợp protein NanoLuc trong điều kiện *in vitro* sử dụng PURExpress 2.0 kit (Genescript, Nhật Bản) (Nishikawa and Ueda, 2001). Thành phần phản ứng bao gồm 2,5 µL dung dịch I; 0,25 µL dung dịch II; 0,5 µL dung dịch III và 50 ng DNA khuôn của gen mã hoá protein NanoLuc (sản phẩm PCR tinh sạch). Đối chứng âm là phản ứng không có chứa DNA khuôn của gen mã hoá protein NanoLuc. Sau khi chuẩn bị, hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37°C trong 2 giờ. Protein NanoLuc

tổng hợp được kiểm tra thông qua khả năng phát sáng khi tác dụng với cơ chất Furimazine (Hình 1) (Nano-Glo® Luciferase Assay System, Promega)



Hình 1: Cơ chế phản ứng của protein NanoLuc và cơ chất Furimazine (England *et al.*, 2016)

2.2.3 Thử nghiệm khả năng nhận diện kháng sinh ức chế sự tổng hợp protein của vi khuẩn của protein tín hiệu NanoLuc

Hai micro lít của mỗi loại kháng sinh (5 mg/mL) gồm oxytetracycline, chloramphenicol và erythromycin được cho vào phản ứng tổng hợp protein NanoLuc, đối chứng dương là phản ứng chứa 2 μ L nước cất và đối chứng âm là phản ứng không có chứa DNA khuôn (DNA mang gen mã hóa protein NanoLuc). Các phản ứng được ủ ở 37°C trong 2 giờ. Sự tổng hợp và ức chế tổng hợp protein NanoLuc được xác định qua khả năng phát sáng của protein NanoLuc dưới tác dụng của cơ chất Furimazine (Nano-Glo® Luciferase Assay System, Promega). Trong trường hợp có sự hiện diện của 1 trong 4 kháng sinh, sự tổng hợp protein NanoLuc sẽ bị ức chế, dẫn đến tín hiệu phát sáng yếu hoặc không có tín hiệu phát sáng. Tín hiệu phát sáng được ghi

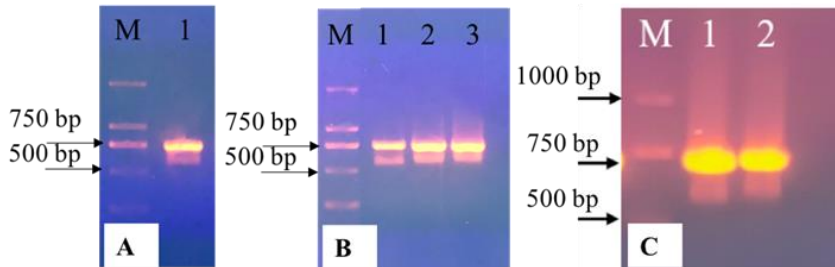
(England *et al.*, 2016) và trên gel SDS PAGE 15% nhuộm Coomassie Blue (CBB).

nhận lại bằng máy chụp ảnh kỹ thuật số (Griss *et al.*, 2014) và được xử lý bằng phần mềm Image J. Ảnh được đổi từ hệ thống màu RGB (RGB type) sang hệ thống đơn sắc (8-bit gray scale), và phân tích cường độ sáng của ảnh.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Chuẩn bị mạch mã khuôn biểu hiện protein NLuc

Plasmid mang gen mã hoá protein NanoLuc được xác định hàm lượng và thực hiện qui trình khuếch đại như mục 2.2. Sản phẩm khuếch đại của gen mã hoá protein NanoLuc cho kết quả ghi nhận ở Hình 2A. Kết quả cho thấy sản phẩm điện di đều hiện rõ vạch 759 bp, là sản phẩm đặc hiệu của NanoLuc. Tuy nhiên ở điều kiện thử nghiệm, ngoài sản phẩm đặc hiệu, kết quả còn cho sản phẩm không đặc hiệu (Hình 2A).



Hình 2: Kết quả thực hiện và chuẩn hoá qui trình PCR khuếch đại gen mã hoá protein NLuc

(A) Kết quả thực hiện qui trình PCR khuếch đại gen mã hoá protein NLuc: giếng M: thang DNA, giếng 1: sản phẩm khuếch đại; (B) Chuẩn hoá nhiệt độ gắn môi: giếng M: thang DNA, giếng 1: 55°C, giếng 2: 56°C, giếng 3: 57°C; (C) Chuẩn hoá nồng độ môi: giếng M: thang DNA, giếng 1: 0,2 μ M/ phản ứng, giếng 2: 0,1 μ M/ phản ứng.

Để giảm bớt lượng sản phẩm không đặc hiệu, một số chỉ tiêu được điều chỉnh bao gồm: i) nhiệt độ gắn môi (tăng từ 55°C lên 57°C và cho sản phẩm khuếch đại rõ, lượng sản phẩm phụ ít, Hình 2B), (ii) nồng độ môi (giảm từ 0,2 μ M xuống còn 0,1 μ M và cho sản phẩm khuếch đại rõ, lượng sản phẩm tương đương, Hình 2C) và (iii) nồng độ Taq polymerase (giảm từ 2U/ phản ứng và cho sản phẩm khuếch đại tương đương ở 1U/ phản ứng). Sau khi chuẩn hoá,

qui trình cho sản phẩm đặc hiệu rõ, lượng sản phẩm không đặc hiệu giảm rõ rệt. Điều này cho thấy ảnh hưởng của nhiệt độ gắn môi, nồng độ môi và hàm lượng Taq DNA polymerase đối với khả năng khuếch đại của qui trình. Mỗi là những đoạn oligonucleotides dài khoảng 20-30 base có trình tự bổ sung với 2 đầu của đoạn DNA mong muốn khuếch đại. Mỗi giữ vai trò quyết định để Taq DNA polymerase tổng hợp được sợi bổ sung, do đó mỗi

có vai trò quyết định tính đặc hiệu của phản ứng PCR. Theo Quyên Đình Thi và *ctv.* (2008), nhiệt độ gắn mỗi thấp dẫn đến sự khuếch đại sản phẩm không đặc hiệu và nhiệt độ gắn mỗi quá cao thì có ít sản phẩm được tạo ra. Ngoài ra, hiệu quả của phản ứng PCR còn phụ thuộc vào nồng độ của mỗi (He *et al.*, 1994), nồng độ mỗi quá cao sẽ làm tăng khả năng mỗi bám vào trình tự không đặc hiệu hoặc mỗi sẽ tự bám vào nhau (Lorenz, 2012). Bên cạnh đó, hàm lượng *Taq* DNA polymerase cao có thể làm tăng lượng sản phẩm không đặc hiệu (Bell and Demarini, 1991).

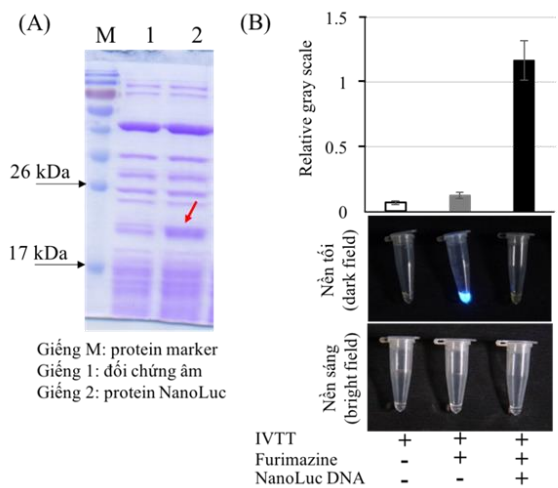
3.2 Xác định sự tổng hợp của protein NanoLuc trong điều kiện *in vitro*

Quá trình tổng hợp protein NanoLuc trong điều kiện *in vitro* bao gồm các thành phần cần thiết cho quá trình phiên mã và dịch mã protein (PUREflex 2.0 kit), 50 ng DNA khuôn của gen mã hoá protein NanoLuc. Sau khi ủ phản ứng ở 37°C trong 2h, 2 µL của phản ứng được load vào gel SDS page 15% để kiểm tra sự hiện diện của protein NanoLuc. Theo kết quả trên gel SDS page, sự hiện diện của NanoLuc ở khoảng 21 kDa (Hình 3A), phù hợp với trọng lượng phân tử của NanoLuc (England *et al.*, 2016). Bên cạnh đó, sự tổng hợp của protein NanoLuc được xác định thông qua sự phát sáng khi tác dụng với cơ chất Furimazine. Hai microlit Nano-Glo Luciferase Assay Substrate (pha loãng 5 lần) chứa cơ chất Furimazine được thêm vào phần còn lại của phản ứng và đặt vào trong hộp tối, tín hiệu phát sáng được ghi nhận bằng máy chụp hình kỹ thuật số. Kết quả cho thấy ở phản ứng có sự hiện diện của DNA khuôn, tín hiệu phát sáng được ghi nhận, ngược lại

ở mẫu âm tính hoặc mẫu không có cơ chất thì không ghi nhận được tín hiệu phát sáng. Cường độ phát sáng của protein NanoLuc được bán định lượng bằng phần mềm xử lý ảnh ImageJ (Hình 3B). Các kết quả này chứng tỏ protein NanoLuc đã được tổng hợp thành công trong điều kiện *in vitro*.

3.3 Khả năng nhận diện nhóm kháng sinh ức chế sự tổng hợp protein của vi khuẩn của protein NanoLuc

Để chứng minh cho tiềm năng phát triển cảm biến sinh học, khả năng nhận diện nhóm kháng sinh ức chế sự tổng hợp protein của vi khuẩn của protein NanoLuc được kiểm tra. Nhóm kháng sinh ức chế tổng hợp protein của vi khuẩn có thể được phân loại thành ba nhóm nhỏ, tùy thuộc vào vị trí gắn vào ribosome của chúng bao gồm (i) gắn vào tiểu đơn vị 30S (nhóm 1), (ii) gắn vào trung tâm peptidyl transferase trên tiểu đơn vị 50S (nhóm 2) và (iii) gắn vào đường thoát peptide trên tiểu đơn vị 50S (nhóm 3) (McCoy *et al.*, 2011). Nghiên cứu này tập trung vào kháng sinh đại diện từ ba nhóm và chọn oxytetracycline (OTC) cho nhóm 1, chloramphenicol (CHL) cho nhóm 2 và erythromycin (ERY) cho nhóm 3 vì oxytetracycline và erythromycin là 2 loại kháng sinh đang sử dụng phổ biến trong nuôi trồng thủy sản ở Việt Nam trong khi chloramphenicol hiện đang được cấm sử dụng. Sau phản ứng tổng hợp protein, kết quả ghi nhận khi phản ứng với cơ chất Furimazine, không nhận thấy tín hiệu phát sáng ở cả 3 loại kháng sinh, trong khi đối chứng dương cho tín hiệu phát sáng bình thường (Hình 4A). Điều này chứng tỏ protein NanoLuc bị ức chế tổng hợp ở mẫu có sự hiện diện của kháng sinh.

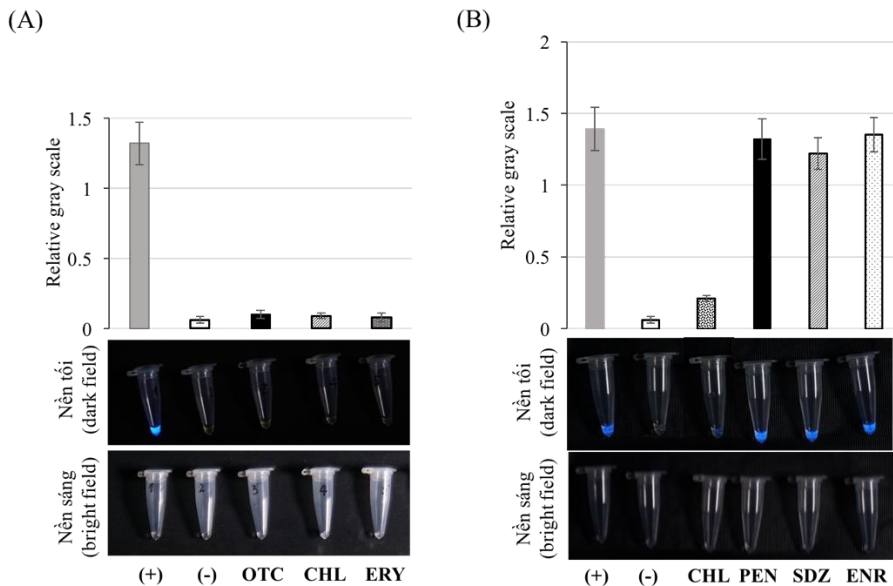


Hình 3: Kết quả kiểm tra sự tổng hợp protein NanoLuc trong điều kiện *in vitro*

(A) Gel SDS page nhuộm CBB; (B) NanoLuc tác dụng với cơ chất Furimazine và phát sáng. Cường độ sáng được bán định lượng bằng phần mềm xử lý ảnh ImageJ, độ lệch chuẩn thể hiện cường độ sáng của 3 phản ứng độc lập.

Nghiên cứu tiếp tục thử nghiệm với một số kháng sinh đại diện cho nhóm có cơ chế hoạt động khác nhằm xác định tính đặc hiệu của protein NanoLuc, bao gồm nhóm ức chế sự tổng hợp thành tế bào, nhóm ức chế sự chuyển hoá acid folic, và nhóm ức chế sự tổng hợp acid nucleic (Kohanski *et al.*, 2010). Penicillin (PEN), sulfadiazine (SDZ) và enrofloxacin (ENR) lần lượt là đại diện cho 3 nhóm kháng sinh trên. Kết quả thể hiện ở Hình 4B cho thấy

các kháng sinh đại diện không thuộc nhóm ức chế sự tổng hợp protein của vi khuẩn đều cho tín hiệu phát sáng tương đương với đối chứng dương, trong khi mẫu thử nghiệm với chloramphenicol thì tín hiệu phát sáng gần như không phát hiện. Điều này chứng tỏ các kháng sinh khác cơ chế không ảnh hưởng đến quá trình nhận biết nhóm kháng sinh mục tiêu của nghiên cứu.



Hình 4: Kết quả kiểm tra khả năng nhận diện nhóm kháng sinh ức chế sự tổng hợp protein của vi khuẩn của protein NanoLuc

(A) Khả năng nhận diện 3 loại kháng sinh đại diện gồm oxytetracycline, chloramphenicol và erythromycine; (B) Tính đặc hiệu của protein NanoLuc khi thử nghiệm với một số kháng sinh có cơ chế hoạt động khác gồm penicillin, sulfadiazine và enrofloxacin.

Trong những năm gần đây, tổng hợp protein trong điều kiện *in vitro* được chú ý nhiều hơn như là một nền tảng thay thế cho các tế bào sống, cung cấp môi trường đơn giản và dễ kiểm soát hơn để nghiên cứu hệ thống sinh học (Hodgman and Jewett, 2013). Hệ thống tổng hợp protein trong điều kiện *in vitro* hay còn gọi là hệ thống tổng hợp protein ngoài tế bào sống (cell-free protein synthesis), bao gồm các thành phần cần thiết để phiên mã, dịch mã và một cấu trúc DNA khuôn, cho phép chuyển phiên mã của một gen (Carlson *et al.*, 2011). Hầu hết thành phần của các hệ thống này đều có nguồn gốc từ vi khuẩn *E. coli*, hoặc mầm lúa mì hoặc từ việc tái tạo các thành phần tinh khiết của *E. coli* (Carlson *et al.*, 2011). Hệ thống này có nhiều ứng dụng trong sinh học tổng hợp, đặc biệt là nền tảng cho thành phần sinh học của cảm biến sinh học (Pardee *et al.*, 2014, 2016; Slomovic *et al.*, 2015), trong đó DNA khuôn thường được cấu trúc mang các gen mã hoá cho các

protein tín hiệu như protein phát huỳnh quang Green Fluorescent Protein (GFP), Yellow Fluorescent Protein (YFP) và β -galactosidase (β -GAL) hay protein phát quang sinh học như Firefly Luciferase (FLuc) và Renilla Luciferase (RLuc).

NanoLuc là protein bổ sung mới nhất hệ thống các protein phát quang sinh học (England *et al.*, 2016). Protein phát quang này có nguồn gốc từ tôm biển *Oplophorus gracilirostris*, với ba lần đột biến để tối ưu hóa lượng phát quang của protein. Người ta phát hiện ra rằng NanoLuc có khả năng phát sáng đặc biệt cao hơn FLuc và RLuc 150 lần (Hall *et al.*, 2012). Ngoài ra, tín hiệu phát quang ổn định và duy trì lâu hơn protein phát quang sinh học trước đó. Với những ưu điểm này, NanoLuc hiện đang được sử dụng như thành phần nhận biết trong cảm biến sinh học, đáng chú ý trong ứng dụng nhận diện kháng sinh trong chẩn đoán y học và trong môi trường

(Duyen *et al.*, 2017; Griss *et al.*, 2014; Lowell *et al.*, 2015).

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Protein NanoLuc được tổng hợp thành công trong điều kiện *in vitro*, có khả năng nhận diện được nhóm kháng sinh ức chế sự tổng hợp protein vi khuẩn và có tính đặc hiệu cao. Protein NanoLuc có tiềm năng phát triển thành cảm biến sinh học nhận diện nhóm kháng sinh ức chế sự tổng hợp protein của vi khuẩn trong môi trường nước.

4.2 Đề xuất

Tiếp tục khảo sát các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp protein tín hiệu NanoLuc trong điều kiện *in vitro* như nhiệt độ, pH và nghiên cứu phát triển cảm biến sinh học nhận diện nhóm kháng sinh ức chế sự tổng hợp protein của vi khuẩn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bell, D.A., and Demarini, D.M., 1991. Excessive cycling converts PCR products to random-length higher molecular weight fragments. *Nucleic Acids*. 19(18): 5079.
- Carlson, E.D., Gan, R., Hodgman, C.E., and Jewett, M.C., 2011. Cell-free protein synthesis: Applications come of age. *Biotechnology Advances*. 30(5): 1185-1194.
- Duyen, T.T.M., Matsuura, H., Ujiie, K., Muraoka, M., Harada, K., and Hirata, K., 2017. Paper-based colorimetric biosensor for antibiotics inhibiting bacterial protein synthesis. *Journal of Bioscience and Bioengineer*. 123(1): 96-100.
- England, C.G., Ehlerding, E.B., and Cai W., 2016. NanoLuc: A small luciferase is brightening up the field of bioluminescence. *Bioconjugate Chemistry*. 27(5): 95-121.
- Griss, R., Schena, A., Reymond, L., *et al.*, 2014. Bioluminescent sensor proteins for point-of-care therapeutic drug monitoring. *Nature Chemical Biology*. 10: 598-603.
- Hall, M.P., Unch, J., Binkowski, B.F., *et al.*, 2012. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chemical Biology*. 7(11): 1848-1857.
- Hoa, P.T.P., Managaki, S., Nakada, N., *et al.*, 2011. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. *Science of The Total Environment*. 409(15): 2894-2901.
- Hodgman, E., and Jewett, M., 2013. Cell-free synthetic biology: Thinking outside of the cell. *Metabolic Engineering*. 14(3): 261-269.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., and Collins, J.J., 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Review Microbiology*. 8(6): 423-435.
- Lorenz, T.C., 2012. Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*. 63: 1-15.
- Lowell, A.N., Santoro, N., Swaney, S.M., *et al.*, 2015. Microscale adaptation of *in vitro* transcription/translation for high-throughput screening of natural product extract libraries. *Chemical Biology and Drug Design*. 86: 1331-1338.
- McCoy, L.S., Xie, Y., and Tor, Y., 2011. Antibiotics that target protein synthesis. *Wiley Interdiscipline Review RNA*. 2(2): 209-232.
- Nishikawa, K., and Ueda, T., 2001. Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nature*. 19: 751-755.
- Pardee, K., Green, A.A., Ferrante, T., *et al.*, 2014. Paper-based synthetic gene networks. *Cell*. 159(4): 940-954.
- Pardee, K., Green, A.A., Takahashi, M.K., *et al.*, 2016. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components. *Cell*. 165(5): 1255-1266.
- Pham, D.K., Chu, J., Do, N.T., Brose, F., Degand, G., Delahaut, P., De Pauw, E., Douny, C., Van Nguyen, K., Vu, T.D., *et al.*, 2015. Monitoring antibiotic use and residue in freshwater aquaculture for domestic use in Vietnam. *Ecohealth*. 12(3): 480-489.
- Phu, T.M., Phuong, N.T., Scippo, M.-L., Dalsgaard, A., Thinh, N., and Huong, D., 2015. Quality of antimicrobial products used in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) aquaculture in Vietnam. *PLoS One*. 10: 1-8.
- Slomovic, S., Pardee, K., and Collins, J.J., 2015. Synthetic biology devices for in vitro and in vivo diagnostics. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United State of America*. 112(47): 14429-14435.
- Suzuki, S., and Hoa, P.T.P., 2012. Distribution of quinolones, sulfonamides, tetracyclines in aquatic environment and antibiotic resistance in Indochina. *Frontiers in Microbiology*. 67(3): 1-8.
- Uchida, K., Konishi, Y., Harada, K., *et al.*, 2016. Monitoring of antibiotic residues in aquatic products in urban and rural areas of Vietnam. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 64(31): 6133-6138.