

NGHIÊN CỨU GEN CÓ VAI TRÒ CHẨN ĐOÁN VI KHUẨN *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Hà Thị Quyên¹, Hoa Thị Minh Tú²

¹Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Viện Công nghệ sinh học,

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nay, nghiên cứu và phát triển các phương pháp sinh học phân tử để phát hiện các loài vi khuẩn gây bệnh tồn tại trong môi trường hoặc trong thực phẩm rất phổ biến như phương pháp lai miễn dịch hoặc các phương pháp dựa trên ADN (lai ADN-ADN, lai ADN-ARN, DNA array, PCR...), trong đó có các chẩn đoán dựa trên lai phân tử và PCR được phát triển và ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực thực phẩm và môi trường. Các chẩn đoán dựa trên DNA đều dựa trên nguyên tắc xác định xem có mặt hay vắng mặt các gen đặc trưng cho từng loài vi khuẩn (hay còn gọi là các gen có vai trò trong chẩn đoán) (Center for food safety & Applied Nutrition, 2001).

Đối với bất cứ định hướng phát triển phương pháp phân tử chẩn đoán vi sinh vật gây bệnh nào thì bước phân lập, tạo dòng các gen đích là bước khởi đầu không thể thiếu. Nhờ đó có được nguyên liệu là các gen đích tinh sạch sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo phục vụ công tác chẩn đoán, giám sát vệ sinh, an toàn, đồng thời có thể phát triển các bộ kit sử dụng trong chẩn đoán, phát hiện căn nguyên bệnh.

Các loài vi khuẩn gây bệnh có thể tồn tại trong nguồn nước sinh hoạt, môi trường nuôi trồng thủy sản, thức ăn,... Từ đó lây nhiễm vào nguồn thức ăn cho người và động vật gây nên ngộ độc thực phẩm. Trong số các vi khuẩn này phải kể đến các vi khuẩn phổ biến như *Salmonella spp*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*,... (Phan 2001; Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, 2003). Trong đó, vi khuẩn *Salmonella* có thể được tìm thấy ở bất kỳ nơi nào có động vật sinh sống như nước, đất, côn trùng, bề mặt các nhà máy, nhà bếp, phân động vật, thịt sống, gia cầm sống, đồ hải sản tươi sống,... Hầu hết các typ huyết thanh đều có khả năng nhiễm vào động vật máu nóng nhưng chỉ 1 số nhỏ gây bệnh cho người. *Salmonella* gây ra nhiều triệu chứng bệnh như sốt thương hàn, nhiễm trùng máu, viêm ruột kết và nhiễm trùng các cơ quan nội tạng (Zhou et al., 1999).

Để gây bệnh, *Salmonella* cần phải xâm nhiễm thành công vào bên trong thành ruột, thích nghi và vô hiệu hoá hệ thống phòng vệ của vật chủ, sau đó nhân lên và phát tán đến các mô đích (Fierer and Guiney 2001). *Salmonella* mang cụm gen *inv* (invasion) giúp cho quá trình xâm nhiễm vào trong thành ruột của người và động vật, mở đầu tiến trình gây bệnh. *invA* là một bản gen luôn có mặt trong hệ thống gen *inv*. Gen *invA* có vai trò trong việc xâm nhiễm vào tế bào biểu mô được chứng minh có mặt rộng rãi trong 245 chủng *Salmonella spp*. khác nhau được phân lập từ người, gà, nước thải. Do vậy, gen *invA* thường được chọn là gen đích trong việc phát hiện *Salmonella spp*. (Galan et al., 1992; Ohl and Miller 2001).

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vi khuẩn *Salmonella typhimurium* được phân lập từ nước thải, nhận từ Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, được nuôi trên môi trường nước pepton.

1. Khuếch đại gen đích bằng PCR

ADN của vi khuẩn *Salmonella typhimurium* được tách chiết như sau:

(1) Ly tâm huyền dịch vi khuẩn, loại bỏ dịch nổi; (2) Cặn tế bào được hoà lại trong dung dịch đệm TE 10:1 (Tris.Cl + EDTA); (3) Bổ sung SDS 10% (sodium dodecyl sulfate) và

proteinaza K, đảo đều, ủ ở 37°C sau 1 giờ để phá vỡ tế bào và loại bỏ protein; (4) Bổ sung NaCl 5M, đảo đều, ủ ở 65°C trong 10 phút; (5) Chiết ADN bằng dung dịch chloroform : isoamylalcohol (24:1) và phenol; (6) Ly tâm thu dịch nổi nằm trên lớp xác tế bào; (7) Chiết lại ADN bằng chloroform : isoamylalcohol (24:1) và phenol; (8) Tủa ADN bằng cách bổ sung NaOAc 3M, cồn 100% và giữ ở -20°C tối thiểu trong 1 giờ; (9) Ly tâm loại bỏ dịch nổi, rửa cặn ADN bằng cồn 70%, làm khô ADN; (10) Hoà lại cặn trong đệm TE chứa ARNaza (100µg/ml), ủ ở 37°C trong 1 giờ để loại ARN; (11) Nồng độ và độ sạch của ADN được xác định bằng phổ hấp phụ trên máy quang phổ tử ngoại và điện di trên gel agarosa 1%.

Chu trình nhiệt PCR nhân gen *invA*: 94°C trong 2 phút; lặp lại 35 chu kỳ: (94°C trong 30 giây, 55°C trong 40 giây, 72°C trong 1 phút 20 giây); 72°C trong 8 phút; kết thúc ở 4°C.

2. Tạo dòng mang gen *invA*

Tạo dòng sản phẩm PCR được tiến hành bằng cách gắn trực tiếp sản phẩm PCR vào vectơ tách dòng pCR2.1 và sử dụng bộ sinh phẩm của hãng Invitrogen. Phản ứng gắn sản phẩm PCR vào vectơ tách dòng pCR2.1: 3µl H₂O khử ion vô trùng + 1µl dung dịch đệm của T₄-ligaza + 3µl sản phẩm PCR + 2µl vectơ pCR2.1 đã mở vòng + 1µl T₄ ligaza. Phản ứng được ủ ở 14°C qua đêm đảm bảo nhiệt độ cho T₄-ligaza hoạt động. Sản phẩm PCR của gen đã được gắn với vectơ tạo nên ADN plasmid (plasmid tái tổ hợp).

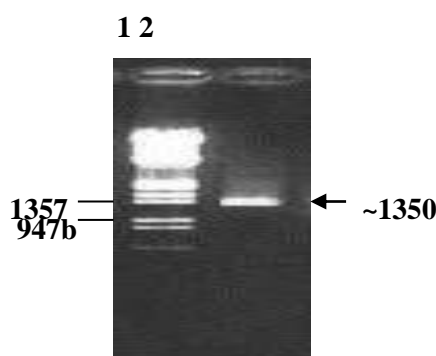
Các ADN plasmid được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* chủng DH5α. Nuôi cấy các chủng này trên môi trường LB có bổ sung kháng sinh Ampicillin X-gal, IPTG qua đêm ở 37°C. Để thu nhận plasmid tái tổ hợp, ADN plasmid được tách chiết lại từ tế bào vi khuẩn đã biến nạp và kiểm tra bằng cách cắt với enzym hạn chế.

3. Tinh sạch ADN plasmid và đọc trình tự gen

ADN plasmid được tinh sạch bằng bộ S.N.A.P Miniprep kit theo quy trình của nhà sản xuất. Trình tự ADN được xác định trên máy xác định trình tự tự động ABI 3100 Avant (Applied Biosystems) với bộ kit BigDye[®] Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit của hãng Applied Biosystems.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Khuếch đại gen *invA* của *Salmonella typhimurium*



Hình 1: Điện di sản phẩm PCR gen *invA* của *Salmonella typhimurium*

Kênh 1: Chỉ thị ADN chuẩn; Kênh 2: Sản phẩm PCR gen *invA*

Dựa trên các trình tự *invA* của *Salmonella typhimurium* đã được công bố trong Genbank, chúng tôi sử dụng phần mềm Primer 3 plus để thiết kế cặp mồi khuếch đại gen *invA*. Mồi cho PCR để nhân gen *invA* được thiết kế có trình tự nucleotit như sau:

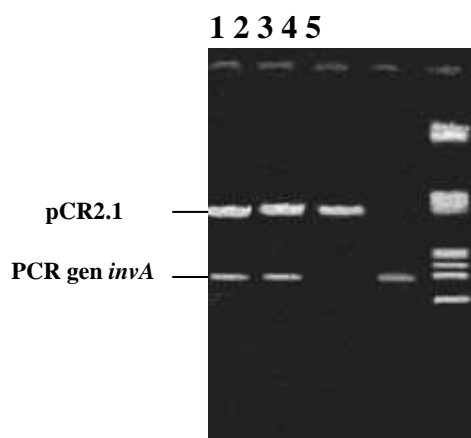
invA1 CGAAGCGTACTGGAAAGGGA

invA2 ATCAGAGGCTTCCGTGTCAA

Sản phẩm PCR đặc hiệu chứa gen *invA* có chiều dài khoảng 1350 bp. Trên hình 1, kết quả điện di cho thấy sản phẩm PCR xuất hiện một băng duy nhất có kích thước khoảng 1350 bp tương đương với tính toán theo lý thuyết. Như vậy, cặp mồi *invA* 1 và *invA* 2 đã được thiết kế rất đặc hiệu bởi vì sản phẩm PCR thu được chỉ cho một băng duy nhất.

2. Tạo các dòng vi khuẩn mang gen *invA*

Để tách dòng gen *invA*, chúng tôi sử dụng vector pCR 2.1 có kích thước 3,9kb. Các sản phẩm PCR gen *invA* được gắn riêng rẽ vào vector pCR 2.1 và biến nạp vào *E. coli* chủng DH5 α . Plasmid tái tổ hợp được tách chiết từ huyền dịch *E. coli* rồi được kiểm tra bằng cách xử lý với enzym cắt hạn chế. Dựa vào đặc điểm thuận lợi của vector pCR 2.1 có mang hai vị trí cắt của enzym *EcoR* I nằm liền kề hai bên vị trí cắt mở vòng nên chúng tôi đã sử dụng *EcoR* I để kiểm tra kết quả tạo dòng. Nếu sản phẩm PCR được gắn vào vector thì khi xử lý bằng *EcoR* I sẽ xuất hiện hai băng, trong đó một băng có kích thước bằng kích thước của sản phẩm PCR. Kết quả được minh chứng trong hình 2.



Hình 2: Điện di sản phẩm ADN plasmid mang gen *invA* sau khi cắt bằng *EcoR* I

Kênh 1, 2: ADN plasmid mang gen *invA* được cắt bằng *EcoR* I; Kênh 3: pCR2.1; Kênh 4: Sản phẩm PCR gen *invA*; Kênh 5: Chỉ thị ADN chuẩn

Kết quả điện di ở hình 2 cho thấy sau khi các plasmid tái tổ hợp được xử lý bằng *EcoR* I xuất hiện hai băng, một băng tương ứng với kích thước của vector pCR2.1 (3,9kb), một băng tương ứng với kích thước của sản phẩm PCR gen *invA* (1350bp).

3. Đọc và phân tích so sánh trình tự gen

Để kiểm tra dòng vi khuẩn được tạo ra có mang đúng gen *invA* mong muốn hay không, chúng tôi tiến hành đọc trình tự nucleotit của sản phẩm PCR gen *invA* và so sánh chúng với trình tự tương đồng trong Genebank. Trình tự nucleotit đoạn gen đã tạo dòng được so sánh với trình tự tương đồng trong Genebank, số đăng ký M90846.1 (Galan et al,1992).

TIÊU BAN ĐA DẠNG SINH HỌC VÀ BẢO TỒN

invA	CGAAGCGTACTGGAAAGGAAAGCCAGCTTTACGGTTCCTTTGACGGTGCGATGAAGTTT	60
invA.M90846	CGAAGCGTACTGGAAAGGAAAGCCAGCTTTACGGTTCCTTTGACGGTGCGATGAAGTTT	660
invA	ATCAAAGGTGACGCTATTGCCGGCATCATTATTATCTTTGTGAACTTTATTGGCGGTATT	120
invA.M90846	ATCAAAGGTGACGCTATTGCCGGCATCATTATTATCTTTGTGAACTTTATTGGCGGTATT	720
invA	TCGGTGGGGATGACTCGCCATGGTATGGATTGGTCTCCGCCCTGTCTACTTATACCATG	180
invA.M90846	TCGGTGGGGATGACTCGCCATGGTATGGATTGGTCTCCGCCCTGTCTACTTATACCATG	780
invA	CTGACCATTGGTGATGGTCTTGTGCGCCAGATCCCCGCATTGTTGATTGCGATTAGTGCC	240
invA.M90846	CTGACCATTGGTGATGGTCTTGTGCGCCAGATCCCCGCATTGTTGATTGCGATTAGTGCC	840
invA	GGTTTTATCGTGACCCGCGTAAATGGCGATACGGATAATATGGGGCGGAATATCATGACG	300
invA.M90846	GGTTTTATCGTGACCCGCGTAAATGGCGATACGGATAATATGGGGCGGAATATCATGACG	900
invA	CAGCTGTTGAACAACCCATTTGTATTGGTTGTTACGGATATTTTGACCATTTCAATGGGA	360
invA.M90846	CAGCTGTTGAACAACCCATTTGTATTGGTTGTTACGGATATTTTGACCATTTCAATGGGA	960
invA	ACTCTGCCGGGATFCCCACTGCCGGTTTTTGTATTTTATCGGTGGTTTTAAGCGTACTC	420
invA.M90846	ACTCTGCCGGGATFCCCACTGCCGGTTTTTGTATTTTATCGGTGGTTTTAAGCGTACTC	1020
invA	TTCTATTTTAAATFCCGTGAAGCAAACCGTAGCGCCGCCAAACCTAAAACCAGCAAAGGC	480
invA.M90846	TTCTATTTTAAATFCCGTGAAGCAAACCGTAGCGCCGCCAAACCTAAAACCAGCAAAGGC	1080
invA	GAGCAGCCGCTCAGTATTGAGGAAAAAGAAGGGTCGTCGTTAGGACTGATTGGCGATCTC	540
invA.M90846	GAGCAGCCGCTCAGTATTGAGGAAAAAGAAGGGTCGTCGTTAGGACTGATTGGCGATCTC	1140
invA	GATAAAGTCTCTACAGAGACCGTACCGTTGATATTACTTGTGCCGAAGAGCCGGCGTGAA	600
invA.M90846	GATAAAGTCTCTACAGAGACCGTACCGTTGATATTACTTGTGCCGAAGAGCCGGCGTGAA	1200
invA	GATCTGGAAAAAGCTCAACTTGCGGAGCGTCTACGTAGTCAGTTCTTTATTGATTATGGC	660
invA.M90846	GATCTGGAAAAAGCTCAACTTGCGGAGCGTCTACGTAGTCAGTTCTTTATTGATTATGGC	1260
invA	GTGCGCCTGCCGGAAGTATTGTTACGAGATGGCGAGGGCCTGGACGATAACAGCATCGTA	720
invA.M90846	GTGCGCCTGCCGGAAGTATTGTTACGAGATGGCGAGGGCCTGGACGATAACAGCATCGTA	1320
invA	TTGTTGATTAATGAGATCCGTGTTGAACAATTTACGGTCTATTTTGATTGATGCGAGTG	780
invA.M90846	TTGTTGATTAATGAGATCCGTGTTGAACAATTTACGGTCTATTTTGATTGATGCGAGTG	1380
invA	GTA AATTATTCGATGAAGTCGTGTCTTTGGTATTAATCCAACAATCCATCAGCAAGGT	840
invA.M90846	GTA AATTATTCGATGAAGTCGTGTCTTTGGTATTAATCCAACAATCCATCAGCAAGGT	1440
invA	AGCAGTCAGTATTTCTGGGTAACGCATGAAGAGGGGAGAAACTCCGGGAGCTTGGCTAT	900
invA.M90846	AGCAGTCAGTATTTCTGGGTAACGCATGAAGAGGGGAGAAACTCCGGGAGCTTGGCTAT	1500
invA	GTGTTGCCGAACGCGCTTGATGAGCTTTACCACTGTCTGGCGGTGACCGTGGCGCGCAAC	960
invA.M90846	GTGTTGCCGAACGCGCTTGATGAGCTTTACCACTGTCTGGCGGTGACCGTGGCGCGCAAC	1560
invA	GTCAATGAATATTTCCGGTATTCAGGAAACAAAACATATGCTGGACCAACTGGAAGCGAAA	1020
invA.M90846	GTCAATGAATATTTCCGGTATTCAGGAAACAAAACATATGCTGGACCAACTGGAAGCGAAA	1620

```

invA      TTCCTGATTTACTTAAAGAAGTGCTCAGACATGCCACGGTACAACGTATATCTGAAGTT 1080
|||||
invA.M90846 TTCCTGATTTACTTAAAGAAGTGCTCAGACATGCCACGGTACAACGTATATCTGAAGTT 1680
|||||

invA      TTGCAGCGTTTGTTAAGCGAACGTGTTCCGTGCGTAATATGAAGTTAATTATGGGAAGCG 1140
|||||
invA.M90846 TTGCAGCGTTTGTTAAGCGAACGTGTTCCGTGCGTAATATGAAGTTAATTATGGGAAGCG 1740
|||||

invA      CTCGCATTGTGGGCGCCAAGAGAAAAAGATGTCATTAACCTTGTGGAGCATATTCGTGGA 1200
|||||
invA.M90846 CTCGCATTGTGGGCGCCAAGAGAAAAAGATGTCATTAACCTTGTGGAGCATATTCGTGGA 1800
|||||

invA      GCAATGGCGCGTTATATTTGTCATAAATTCGCCAATGGCGGCGAATTACGAGCAGTAATG 1260
|||||
invA.M90846 GCAATGGCGCGTTATATTTGTCATAAATTCGCCAATGGCGGCGAATTACGAGCAGTAATG 1860
|||||

invA      GTATCTGCTGAAGTTGAGGATGTTATTCGCAAAGGGATCCGTCAGACCTCTGGCAGTACC 1320
|||||
invA.M90846 GTATCTGCTGAAGTTGAGGATGTTATTCGCAAAGGGATCCGTCAGACCTCTGGCAGTACC 1920
|||||

invA      TTCCTCAGCCTTGACACGGAAGCCTCTGAT 1350
|||||
invA.M90846 TTCCTCAGCCTTGACACGGAAGCCTCTGAT 1950
|||||

```

Identities = 1348/1350 (100%), Gaps = 0/1350 (0%; Strand=Plus/Plus

Hình 3: So sánh trình tự *invA* đã tạo dòng với trình tự tương đồng trong Genebank

Kết quả so sánh bằng công cụ blast trên NCBI cho thấy hai trình tự trên có sự tương đồng nucleotit là 100%. Như vậy, với kết quả đọc và so sánh trình tự nucleotit của đoạn gen *invA* đã tạo dòng với trình tự tương đồng trong Genebank cho thấy chúng tôi đã tạo được các dòng vi khuẩn mang chính xác gen *invA*.

III. KẾT LUẬN

Đã thiết kế được cặp mồi đặc hiệu cho việc nhân gen *invA* của *Salmonella typhimurium*, cặp mồi này có thể được tiếp tục nghiên cứu và phát triển cho định hướng chế tạo kit chẩn đoán.

Đã tạo được các dòng vi khuẩn mang gen *invA*. Các dòng này được lưu giữ để cung cấp nguyên liệu ADN cho các nghiên cứu ứng dụng sau này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Center for food safety & Applied Nutrition**, 2001. *Bacteriological Analytical Manual Online: Identification and Foodborne Bacterial pathogens by gene probes*. Chapter 24.
2. **Fierer J., Guiney D. G.**, 2001. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *The Journal of Clinical investigation*, 107(7): pp. 775-780.
3. **Galan J.E., Ginocchio C. and Costeas P.**, 1992. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of InvA to members of a new protein family. *J. Bacteriology*, 174 (13): 4338-4349.
4. **Ohl M.E., and Miller S. I.**, 2001. *Salmonella*: A model for bacterial pathogenesis. *Annual Review of Medicine*, 52: 259-274
5. **Phan T. K.**, 2001. *Foodborne Diseases*, Youth Publisher, 5-38
6. **Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương**, 2003. *Thống kê các bệnh truyền nhiễm 1993-2003*. Nxb. Y học.

7. **Zhou D., Hardt W. D., Galan J. E.**, 1999. *Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. *Infection and Immunity* 67: 1974-1981.

STUDY ON GENE FOR DIAGNOSIS OF *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Ha Thi Quyen, Hoa Thi Minh Tu

SUMMARY

Research and detection of genes having function for diagnose pathogenic bacteria are essential for environmental and safe food surveillance. In this study, we designed specific primers and constructed a thermal cycle to amplify the specific fragment of the *invA* gene that encodes the protein invasion of *Salmonella typhimurium*, having function for infection to the host. In addition, the bacterial clones containing *invA* gene has been cloned. The exact determination of the *invA* gene in this report was confirmed by nucleotide sequencing and compared to homology sequences in Genbank. The results of this study could be used to develop a *Salmonella* Diagnostic Kit using PCR. And the clones containing the *invA* gene would be stored to provide target genes for continuing studies.