

PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ GIEN *PHE*S CHO VIỆC XÁC ĐỊNH LOÀI VI KHUẨN LACTIC SINH BACTERIOCIN

Nguyễn Thị Lâm Đoàn¹, Ngô Xuân Mạnh¹, Nguyễn Thị Đà²,
Vũ Thị Hằng¹, Nguyễn Xuân Bắc¹

¹Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Liên hệ với tác giả: nlddoan@yahoo.com

Đến Tòa soạn ngày

1. MỞ ĐẦU

Bacteriocin của vi khuẩn lactic là một trong những hướng đã và đang được quan tâm của công nghệ sinh học hiện đại. Các bacteriocin của vi khuẩn được xem là có tiềm năng to lớn trong bảo quản vì hầu hết vi khuẩn lactic được coi là an toàn. Bacteriocin của vi khuẩn lactic được coi là nhân tố ức chế tự nhiên, ngăn ngừa những vi khuẩn gây bệnh và gây thối hỏng trong thực phẩm [3, 4]. Vì vậy ngày càng có nhiều phát hiện về bacteriocin mới do vi khuẩn lactic sinh ra [1, 11,]. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này định tên loài của chủng sinh bacteriocin cao để bước đầu có thể biết bacteriocin được sinh ra từ loài nào thuộc nhóm nào. Trước đây phân loại vi sinh vật theo các phương pháp truyền thống dựa các đặc tính hình thái, sinh lí và hóa sinh [12] Các đặc trưng này đôi khi cũng bộc lộ những hạn chế dẫn đến nhiều trường hợp phải xác định lại tên phân loại của một số vi sinh vật. Từ những hạn chế trên cùng với những tiến bộ trong sinh học phân tử đã mở ra khả năng ứng dụng hữu hiệu trong phân loại học và nghiên cứu đa dạng vi sinh vật. Nếu như các phương pháp truyền thống chỉ có thể tập trung trên những đối tượng vi sinh vật nuôi cấy được thì phương pháp sinh học phân tử có thể áp dụng đối với cả những vi sinh vật nuôi cấy được và những vi sinh vật không nuôi cấy được [12]. Đặc biệt vi khuẩn lactic là một nhóm rất nhiều chi và ngay trong một chi cũng có sự đa dạng rất lớn về loài nên thường khó khi sử dụng phương pháp truyền thống để xác định chúng ngay cả ở mức chi. Vì vậy, nghiên cứu này tập trung vào ứng dụng kĩ thuật sinh học phân tử dựa trên phân tích dữ liệu trình tự gen *pheS* để xác định chủng vi khuẩn lactic sinh bacteriocin cao từ nem chua. Trong thời gian gần đây, một đoạn gen *pheS* ngắn rất được quan tâm như một ứng cử viên tiềm năng để xác định mối quan hệ phát sinh loài. Gen *pheS* mã hoá cho protein phenylalanyl – tRNA synthase, đây là protein đóng vai trò là enzym có tác dụng xúc tác cho việc chuyển phenylalanine đến tRNA để tham gia vào quá trình sinh tổng hợp protein [2,7]. Đã có nhiều nghiên cứu cho thấy rằng sử dụng đoạn gen ngắn mã hóa cho một protein nào đó như một dụng cụ hữu hiệu để xác định các loài hơn là sử dụng gen ribosomal vì chúng cho tỉ lệ khác nhau lớn và cho phép sự phân biệt cao của các loài gần nhau trong nhóm vi khuẩn lactic hơn hầu hết xác định nhờ phân tích trật tự gen 16S rRNA [5, 6, 8]. Sản phẩm PCR là một đoạn gen dài 450 base pair [9]. Đây là công cụ rất có giá trị trong phân tích nguồn gốc phát sinh loài của các chủng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng vi khuẩn lactic sinh bacteriocin cao đã được phân lập từ mẫu nem chua Hà Nội (kí hiệu chủng DV4.10). Chủng DV4.10 thuộc gram (+), tế bào hình cầu, không có hoạt tính catalase, có hoạt tính sinh tổng hợp bacteriocin.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tách chiết DNA

Chủng sinh bacteriocin mạnh này được nuôi cấy trong môi trường MRS agar (Oxoid) tại 30°C trong 24 giờ. Chủng này được mã hóa R-42380 (DV4.10). DNA genomic của chủng được tách chiết theo phương pháp của Gevers et al. 2001 [5]. Sau khi nuôi cấy được 24 giờ, sinh khối tế bào được chuyển vào ống eppendorf và được rửa với 800 µl TES. Li tâm 10 phút tốc độ 5000 vòng trong 1 phút ở 4°C, loại bỏ phần dung dịch thu sinh khối tế bào để bảo quản trong tủ lạnh - 20°C (tối thiểu 1 giờ - tối đa 1 tuần). Tiếp theo tiến hành tách chiết DNA theo các bước sau:

Rửa tế bào (làm tan lạnh - rửa tế bào với 400 µl TES – li tâm 5 phút tốc độ 1000 vòng trong 1 phút ở 4°C – loại bỏ phần dung dịch).

Phá vỡ tế bào (cho 300 µl STET vào eppendorf có chứa tế bào ở trên – Thêm 75 µl lysozyme – mutanolysine – Đổ 37°C trong 60 phút – Cho 40 µl SDS 20% ấm ở 37°C - Thêm 10 mg cát trắng – Lắc mạnh 60 giây – Giữ ở 37°C trong 10 phút - Tiếp tục giữ ở 65°C trong 10 phút).

Tinh sạch dung dịch DNA: thêm 100 µl dung dịch đệm TE – cho 515 µl hỗn hợp dung dịch phenol: chloroform: isoamylalcohol theo tỉ lệ 24 : 24 : 1 – li tâm 5 phút tốc độ 13000 vòng trong 1 phút ở 4°C – chuyển phần dịch nổi sang ống eppendorf mới.

Kết tủa DNA: cho 70 µl NaCl 5M và 1 ml isopropanol lạnh - đảo ngược eppendorf 1 - 2 lần để tủa DNA, li tâm 30 phút tốc độ 13000 vòng trong 1 phút ở 4°C - đổ bỏ dịch nổi một cách nhẹ nhàng

Rửa và làm khô DNA: cho 500 µl ethanol 70% lạnh - li tâm 5 phút tốc độ 13000 vòng trong 1 phút ở 4°C - đổ bỏ dịch nổi một cách nhẹ nhàng - làm khô trên giấy thấm, để khô tự nhiên trong không khí khoảng 20 phút – thêm 100 – 150 µl dung dịch TE – bảo quản DNA ở - 20°C – ngày tiếp theo cho thêm 1,5 µl RNAase 10 mg/ml và ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Chất lượng và độ tinh sạch DNA được kiểm tra bằng cách đo quang phổ ở bước sóng 234, 260 và 280 nm (SpectraMax Plus384, Molecular Devices, California, USA) và điện di trên gel 1% w/v agarose trong 45 phút ở điện thế 75V của 5 µL DNA trộn với 2 µL loading dye (4 g sucrose và 2,5 mg bromophenol blue hòa tan trong 6 mL đệm TE). Marker được sử dụng là SmartLadder, Eurogentec, Searing, của Bỉ.

2.2.2. Phương pháp khuếch đại PCR cho giải trình tự gen *pheS*

Mồi PheS-21-F (5'-CAYCCNGCHCGYGAYATGC-3') và PheS-22-R (5'-CCWARVCCRAARGCAAARCC-3') được dùng để nhân lên đoạn gen *pheS* [6]. Phản ứng được tiến hành với DNA pha loãng (OD=1). Thể tích PCR của 50 µl gồm 5 µl của 10x PCR buffer (15 mM MgCl₂), 5 µl deoxynucleoside triphosphates (2 mM của mỗi loại dNTP), 0,5 µL của mỗi mồi (50 µM), 1 µL Taq polymerase (1U µl⁻¹), 37 µL nước cất, và 1 µl của dung dịch

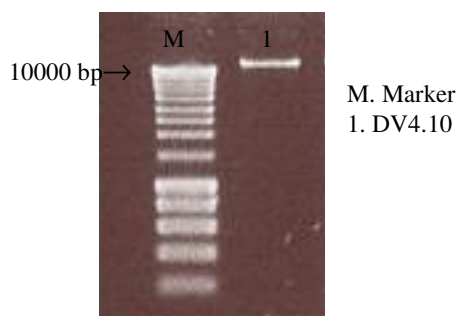
DNA. PCR được thực hiện sử dụng máy GeneAmp PCR 9600 thermocycler (Applied Biosystem). Chu trình nhiệt bao gồm (1) 5 phút ở 95°C, (2) 3 chu trình 1 phút ở 95°C + 2 phút 15 giây ở 46°C + 1 phút 15 giây ở 72°C, 30 chu trình 35 giây ở 95°C + 1 phút 15 giây ở 46°C + 1 phút 15 giây ở 72°C, (4) cuối cùng 7 phút 72°C [6]. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách lấy 5 µl sản phẩm PCR với 2 µl của loading dye, điện di trên gel agarose 1% ở 75 V trong 45 phút. Marker được sử dụng là SmartLadder, Eurogentec, Searing, của Bỉ. Sau khi kiểm tra nếu sản phẩm PCR có kích thước đúng như kích thước của đoạn gen *pheS* sẽ được tinh sạch nhờ sử dụng hệ thống màng lọc Nucleofast 96 PCR (Macherey - Nagel). Tiếp theo đó để giải trình tự gen *pheS* thì sản phẩm PCR vừa tinh sạch ở trên sẽ được chạy PCR lần thứ hai. Thể tích PCR là 10 µl gồm 3 µl sản phẩm PCR đã được tinh sạch, 1,857 µl nước cất, 1,857 µl 5 × dung dịch đệm sequencing, mỗi 3 µl (4 µM) mỗi xuôi và mỗi ngược tách biệt, Bigdye 0,286 µl. Chương trình nhiệt gồm 30 chu trình 15 giây ở 96°C + 1 giây ở 35°C + 4 phút ở 60°C. Sau đó 10 µl sản phẩm PCR cho mỗi xuôi và 10 µl sản phẩm PCR cho mỗi ngược được chuyển vào 2 giếng của đĩa 96 giếng và thêm 45 µl dung dịch SAM, 10 µl XTerm. Giải trình tự được thực hiện nhờ máy ABI PRISM 3100 (Applied Biosystem).

2.2.3. Phương pháp phân tích trình tự gen *pheS* và xác định loài

Số liệu trình tự thô được chuyển đến AutoAssemble software 1.40 (applied Biosystem) hoặc GeneBuilder (Applied Maths), trình tự liên tục của gen *PheS* được xác định. Trình tự liên tục này sẽ được nhập vào chương trình Bionumeric 5.1 (Applied Maths), giá trị tương đồng của các loài và cây phân loại được tạo ra dựa vào phương pháp neighbourjoining và maximum-parsimony [10]. Trình tự của chúng này được so sánh với các loài trong ngân hàng gen BCCM/LMG của Đại học Gent (Gent, Bỉ) hoặc chuỗi DNA này được so sánh với ngân hàng trình tự nucleotit quốc tế (EMBL) và thực hiện nhờ sử dụng chương trình FASTA để xác định loài có mối liên quan gần nhất đã biết của trình tự trong phân gen *pheS*.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chất lượng và độ tinh sạch DNA của chủng DV4.10



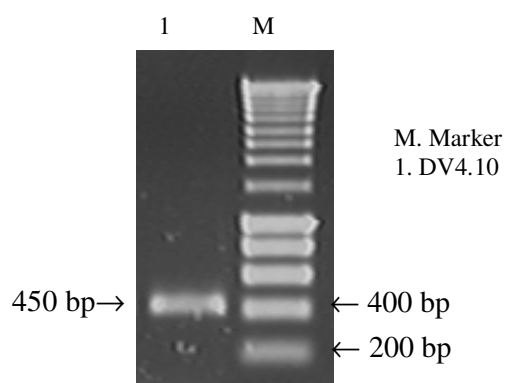
Hình 1. Chất lượng và độ tinh sạch DNA của chủng DV4.10 trên gel agarose 1%

DNA genomic của chủng DV4.10 được tách chiết theo phương pháp của Gevers et al. 2001 [5] như protocol trong phần 2.1. Chất lượng và độ tinh sạch DNA được kiểm tra bằng cách điện di trên 1% w/v agarose trong 45 phút ở điện thế 75V của 5 µL DNA trộn với 2 µL loading dye. Kết quả được chỉ ra trong hình 2.

Hình 1 cho thấy sau khi chạy điện di mẫu DNA genomic của chủng DV4.10 chỉ thu một vạch đậm có kích thước lớn hơn 10000 bp. Chủng tỏ tách chiết DNA của chủng DV4.10 đã thành công, không có hiện tượng đứt gãy DNA và không lẫn RNA.

3.2. Sản phẩm PCR đoạn gen *pheS* của chủng DV4.10

Sau khi DNA của chủng DV4.10 tách chiết, tiến hành nhân đoạn gen *pheS* với các primer và protocol như phần 2.2. Sản phẩm PCR được chạy điện di trên gel agarose 1%. Kết quả điện di sản phẩm PCR đã thu được một băng khoảng 450 bp (hình 2) tương ứng với kích thước của đoạn gen *PheS* [9]. Như vậy, khuếch đại đoạn gen *PheS* của chủng DV4.10 đã cho kết quả tốt.

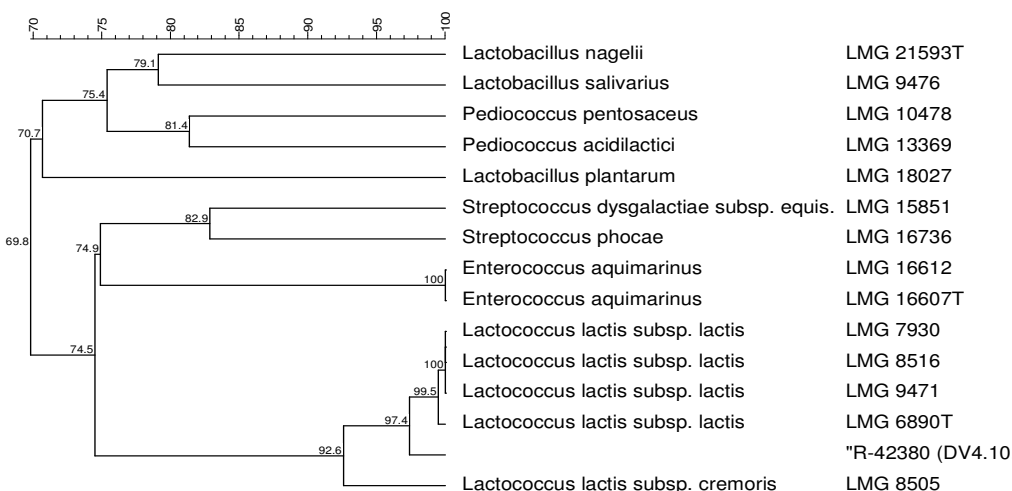


Hình 2. Sản phẩm PCR đoạn gen *pheS* của DV4.10 trên gel agarose 1%

3.3. Giải trình tự DNA của chủng DV4.10 và xác định loài

Bảng 1. Xác định loài của chủng DV4.10 nhờ so sánh với ngân hàng trật tự nucleotide (EMBL)

Chủng	Loài có mối quan hệ gần nhất	% ID	Accession no.
DV4.10	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	98	EM_PRO:AE005176
	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	97,8	EM_PRO:CP001834
	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	92,4	EM_PRO:CP000425
	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	92,2	EM_PRO:AM406671



Hình 3. Cây phát sinh chủng loài của DV4.10 được so sánh với các loài trong ngân hàng gen *pheS* của BCCM/LMG của Đại học Gent (Gent, Bỉ), số Bootstrap (≥ 50), thước đo thể hiện 10 nucleotit khác nhau trên 100 nucleotide so sánh

Sau khi kiểm tra nếu sản phẩm PCR có kích thước đúng như kích thước của đoạn gen *pheS* sẽ được tinh sạch, chạy PCR với mỗi xuôi, mỗi ngược tách biệt và sử dụng chương trình nhiệt như đã miêu tả trong phần 2.2. Trình tự của chúng này được so sánh với các loài trong ngân hàng gen BCCM/LMG của Đại học Gent (Gent, Bỉ) hoặc đoạn DNA này được so sánh với ngân hàng trình tự nucleotit quốc tế (EMBL) và thực hiện nhờ sử dụng chương trình FASTA để xác định loài có mối liên quan gần nhất đã biết của trình tự trong phần gen *pheS*. Kết quả được trình bày ở bảng 1 và hình 3.

Như vậy, khi so sánh trình tự gen *pheS* của chủng DV4.10 với ngân hàng trình tự nucleotide quốc tế (EMBL) nhờ sử dụng chương trình FASTA thì chủng này có mối liên quan gần nhất với loài *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* giống nhau về trình tự lên 98% sau đó đến giống với loài *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* là 92,4% (bảng 1). Như vậy, chủng này là loài *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả khi so sánh chủng này với ngân hàng gen *pheS* của các loài vi khuẩn trong ngân hàng gen của BCCM/LMG của Đại học Gent (Gent, Bỉ). Khi đưa đến ngân hàng gen của BCCM/LMG của Đại học Gent, Bỉ thì chủng DV4.10 được nhận một số R-42380 (DV4.10). Ở ngân hàng gen này chủng DV4.10 có trình tự tương đồng với chủng LMG7930, LMG8516, LMG9471, LMG6890T các chủng này đều là loài *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Sự tương đồng về trình tự gen *PheS* của chủng DV4.10 với các chủng này là 97,4%. Trong khi đó chủng DV4.10 có trình tự tương đồng 92,6% với LMG 8505 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) (hình 3).

Qua các kết quả trên thì chủng DV4.10 là loài *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

4. KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật phân tích trình tự gen *pheS*, đã xác định chủng (DV4.10) có hoạt tính sinh tổng hợp bacteriocin mạnh là loài *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Như vậy, với việc sử dụng đoạn gen ngắn mã hóa cho một protein nào đó, gen *pheS* mã hoá cho protein phenylalanyl –

tRNA synthase như một dụng cụ hữu hiệu để xác định các loài và cho phép phân biệt cao giữa các loài gần nhau trong nhóm vi khuẩn lactic.

Lời cảm ơn. Tác giả xin được cảm ơn sự hợp tác của phòng thí nghiệm Vi sinh vật của trường Đại học Ghent, Bỉ tạo điều kiện để tác giả thực hiện nội dung nghiên cứu này và cảm ơn tất cả các đồng nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. B. Batdorj, M. Dalgarrondo, Y. Choiset, J. Pedroche, F. Métro, H. Prévost, J. -M. Chobert, and T. Haertlé - Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag, *Journal of Appl. Microbiology* **101** (2006) 837-848.
2. D. Beyer, H. P. Kroll, R. Endermann, G. Schiffer, S. Siegel, M. Bauser, J. Pohlmann, M. Brands, K. Ziegelbauer, D. Haebich, C. Eymann, and H. B. Oesterhelt - New Class of Bacterial Phenylalanyl-tRNA Synthetase Inhibitors with High Potency and Broad-Spectrum Activity, *Antimicrobial agents and chemotherapy* (2004) 525-532.
3. E. C. M. Bruno and T. J. Montville - Common Mechanistic Action of Bacteriocins from Lactic acid Bacteria, *Appl Environ Microbiol* **59** (1993) 3003-3010.
4. P. M. Davidson, J. N. Sofos, A. L. Brane - *Antimicrobial in food*, Third edition, CRC Press Toylaf and Francis group.
5. D. Gevers, G. Huys, and J. Swings - Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species, *FEMS Microbiol. Lett.* **205** (2001) 31-36
6. D. B. Katrien, C. M. A. P. Franz, M. Vancanneyt, U. Schillinger, F. Mozzi, G. F. D. Valdez, L. D. Vuyst, and P. Vandamme - *Pediococcus argentinicus* sp. nov. from Argentinean fermented wheat flour and identification of *Pediococcus* species by *pheS*, *rpoA* and *atpA* sequence analysis, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58** (2008) 2909-2916.
7. D. B. Katrien, N. Camu, L. D. Vuyst, and P. Vandamme - *Lactobacillus fabifermentans* sp. nov. and *Lactobacillus cacaonum* sp. nov., isolated from Ghanaian cocoa fermentations, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59** (2009) 7-12.
8. S. M. Naser, P. Dawyndt, B. Hoste, D. Gevers, K. Vandemeulebroecke, I. Cleenwerck, M. Vancanneyt, and J. Swings - Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57** (2007) 2777-2789.
9. S. M. Naser, F. L. Thompson, B. Hoste, D. Gevers, P. Dawyndt, M. Vancanneyt, and J. Swings - Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes, *Microbiology* **151** (2005) 2141-2150.
10. N. Saitou, and M. Nei . The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4** (1987) 406-425.
11. F. Villani, M. Aponte, G. Blaiotta, G. Mauriello, O. Pepe, G. Moschetti. Detection and characterization of bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from cow s milk, *Journal of Applied Microbiology* **90** (2001) 430-439.

12. Dương Văn Hợp, Nguyễn Lâm Dũng - Phân loại vi sinh bằng sinh học phân tử, Vietsciences, 27/02/2007; http://baigiang.violet.vn/present/showprint/entry_id/215088.

SUMMARY

***PHE* GENE SEQUENCE ANALYSIS FOR THE IDENTIFICATION OF A LACTIC ACID BACTERIUM PRODUCING BACTERIOCIN FROM NEM CHUA**

The aim of this study was to identify species level of producing bacteriocin strain isolated from Ha Noi nem chua (DV4.10) by *pheS* gene sequencing analysis. Genomic DNA DV4.10 was extracted. Then *pheS* gene was run the first PCR with PheS-21-F (5'-CAYCCNGCHCGYGAYATGC-3') and PheS-22-R (5'-CCWARVCCRAARGCAAARCC-3'). PCR product was checked by by electrophoresis on a 1% (wt/vol) agarose gel at 75 V for 45 min with marker (SmartLadder, Eurogentec, Searing, Belgium). PCR product of DV4.10 collected a bold band at 450 bp position similar to size of *pheS* gene [6]. This PCR product continued to run the second PCR with seperated primer, purified, sequenced and compared to sequencing of known sequence database in EMBL or BCCM/LMG collection of Gent university, Belgium. The result showed that DV4.10 is *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* species. Thus, the *pheS* gene sequence provides a useful tool. It have a higher discriminatory power for reliable identification of species level.