

PHÁT TRIỂN KỸ THUẬT LAMP (LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION) CHO VIỆC PHÁT HIỆN NHANH VÀ CHÍNH XÁC VI KHUẨN *Escherichia coli* O157: H7

Hoàng Phú Hiệp¹, Lê Quang Huân^{2*}

⁽¹⁾Đại học Sư phạm Thái Nguyên

^(2*)Viện Công nghệ sinh học, huanlequang@gmail.com

TÓM TẮT: Vi khuẩn *Escherichia coli* O157:H7 là nguyên nhân quan trọng gây nên các vụ ngộ độc thực phẩm và gây chết người trên toàn thế giới. Một kỹ thuật phát hiện nhanh và chính xác là rất quan trọng. Shiga toxin 2 (mã hóa bởi gen *stx2*) là một tác nhân quan trọng gây của dòng STEC nói chung và *E. coli* O157:H7 nói riêng, do vậy gen *stx2* là một trong những gen đích cho rất nhiều các kỹ thuật phát hiện sử dụng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phát triển kỹ thuật LAMP để phát hiện nhanh và chính xác chủng vi khuẩn *Escherichia coli* O157:H7. Kỹ thuật này có ưu điểm là phát hiện nhanh, chính xác và thiết bị đơn giản. Bộ môi được thiết kế đặc biệt dựa trên trình tự gen *stx2*. Chúng tôi nhận thấy không có sự khác nhau khi sử dụng duy nhất mỗi trong (BIP/FIP) hoặc cả 4 môi. Phản ứng dương tính được quan sát bằng mắt thường khi sử dụng SYBR green hoặc dưới tia UV.

Từ khóa: *Escherichia coli* O157: H7, LAMP, *stx2* gen, FIP, BIP.

MỞ ĐẦU

Escherichia coli O157:H7 (*E. coli* O157:H7) thuộc nhóm vi khuẩn tạo độc tố Shiga (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC). Vi khuẩn *E. coli* O157:H7 là một trong những nguyên nhân chính nên các vụ ngộ độc thực phẩm và một số bệnh ở người như: tiêu chảy, viêm ruột, hội chứng sung huyết và suy thận (Hemolytic Uremic Syndrome, HUS) [2]. Theo Rasekh et al. (2005) [5], có khoảng 1,8 triệu người chết vì hội chứng sung huyết trong khi số người tử vong do ngộ độc thực phẩm chưa thống kê được.

Việc phát hiện nhanh *E. coli* gây bệnh là rất quan trọng, vì vậy, một phương pháp phát hiện chính xác và hiệu quả là rất cần thiết. Hiện nay, việc phát hiện nhân tố gây bệnh thường dựa trên cơ chế và độc tố gây bệnh của các chủng vi khuẩn. Kỹ thuật LAMP là phương pháp nhân bản DNA nhanh được phát triển bởi Notomi et al. (2000) [4, 9], kỹ thuật này được ứng dụng để phát hiện virus, vi khuẩn, nấm và ký sinh vật. Phương pháp này yêu cầu một bộ môi đặc biệt để nhận ra từ 2- 6 vùng trên gen đích, do vậy làm tăng độ nhạy cũng như độ nhanh của phản ứng. Kết quả của phản ứng LAMP có thể được quan sát bằng mắt thường hay bằng điện di trên gel agarose hoặc thêm thuốc nhuộm phát quang dưới tia UV. Kỹ thuật LAMP được thực hiện

trong điều kiện đẳng nhiệt vì vậy, chỉ cần sử dụng các thiết bị giữ nhiệt như bể ổn nhiệt, tủ ấm. Hơn nữa, thành phần phản ứng có thể bảo tồn trong một tháng khi giữ ở nhiệt độ 37°C tốt hơn đề xuất của nhà sản xuất [7]. Với những ưu điểm đó, kỹ thuật LAMP trở thành kỹ thuật được sử dụng rộng rãi trong các phương pháp phát hiện nhanh và chính xác.

Đã có một vài nghiên cứu kỹ thuật LAMP để phát hiện vi khuẩn *E. coli* O157:H7 và một số vi khuẩn độc mang gen *stx2* được nghiên cứu trên thế giới [1, 3, 8]. Tuy nhiên, ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào được công bố. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật LAMP cho việc phát hiện nhanh và chính xác chủng vi khuẩn *E. coli* O157:H7 tại Việt Nam nhằm tạo tiền đề cho việc phát triển kit thử nhanh vi khuẩn *E. coli* O157:H7 trong thực phẩm cũng như các mẫu nghiên cứu khác.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Vi khuẩn *E. coli* O157:H7, chủng này được cung cấp từ bộ môn Vi sinh vật, Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Enzyme Bst polymerase, đệm, dNTP của hãng Biolabs; các cặp môi được đặt của invitrogen tổng hợp.

Các cặp mồi: VT2BIP (469-489): 5'-TGCTCTGGATGCATCTCTGGTCATATCTG GTTTCATCATATCTGGCG-3'; VT2FIP (588-608): 5'-GCGTTTTGTCACACTGTCACAGCAG ATAGCCTGACGAAATTCTCTCTGT-3'; B1c (514-537): 5'-TGCTCTGGATGCATCTCTGG TCAT-3'; F1c (543-566): 5'-GCGTTTTGTCAC TGTCACAGCAGA-3'.

Các cặp mồi chúng tôi sử dụng theo thiết kế của Maruyama et al. (2003) [3].

Phương pháp

Phương pháp tách DNA tổng số của vi khuẩn được tiến hành theo phương pháp của Sambrook & Russell (2001) [6].

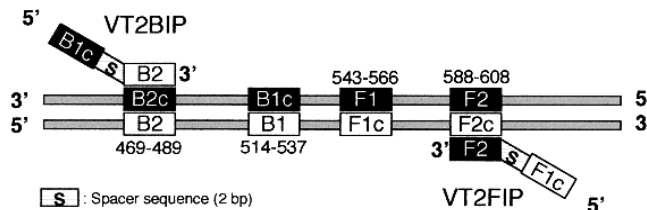
Thành phần phản ứng LAMP như sau: đệm (10X): 2,5 μ l, dNTP (10mM): 2,5 μ l, mồi BIP (10pmol/ μ l): 0,8 μ l, mồi FIP (10pmol/ μ l):

0,8 μ l, Bst DNA polymerase (5u/ μ l): 0,2 μ l, DNA template (6 μ g/ml): 1 μ l, H₂O: 17,2 μ l. Chu trình nhiệt như sau: 94°C 5 phút; 63°C 60 phút, 80°C 10 phút.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Mồi và cách thiết kế mồi

Thông thường, bộ mồi của kỹ thuật LAMP gồm từ 4-6 cặp mồi. Bộ mồi có một cặp mồi dùng tách đồng gen, một bộ mồi trong và một bộ mồi ngoài. Những cặp mồi này thường được thiết kế dựa trên phần mềm PrimerExplorer V4 [9]. Tuy nhiên, theo nghiên cứu của Maruyama et al. (2003) [3] số bộ mồi tối thiểu là 1 cặp gồm cặp mồi BIP/FIP. Do vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng bộ mồi theo nghiên cứu của Maruyama nhằm làm sáng tỏ thêm vấn đề này. Trình tự và vị trí của cặp mồi như hình 1.



VT2BIP: 5'-TGCTCTGGATGCATCTCTGGTCATATCTGGTTTCATCATATCTGGCG-3'
 Vị trí trình tự: B1c S B2
 VT2FIP: 5'-GCGTTTTGTCACACTGTCACAGCAGATAGCCTGACGAAATTCTCTCTGT-3'
 Vị trí trình tự: F1c S F2

Hình 1. Trình tự và vị trí cặp mồi FIP/BIP

Tách chiết DNA tổng số từ tế bào vi khuẩn

Chúng tôi tiến hành tách chiết cả DNA tổng số và DNA plasmid, tuy nhiên, khi sử dụng DNA plasmid làm mẫu thì phản ứng không xảy ra. Vì vậy, mẫu chúng tôi sử dụng là DNA tổng số. Cùng với vi khuẩn *E. coli* O157:H7, chúng tôi sử dụng vi khuẩn *E. coli* ATCC làm đối chứng âm. DNA tổng số của hai chủng được tách theo phương pháp của Sambrook và Russel mô tả có cải biến [6]. Sau đó, DNA tổng số được điện di trên gel agarose 1%. Kết quả được thể hiện trên hình 2. Qua hình 2 ta thấy chỉ xuất hiện 1 băng sáng và rõ chứng tỏ DNA tổng số được tách chiết từ vi khuẩn *E. coli* O157:H7 và ATCC có thể sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

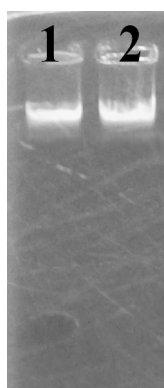
Phản ứng LAMP

Trước khi tiến hành phản ứng, DNA mẫu được biến tính ở 94°C trong thời gian 5 phút, sau đó đặt trên đá 3 phút rồi bổ sung thêm enzyme Bst polymerase. Phản ứng được tiếp tục ở 63°C trong thời gian từ 30 giây đến 1 giờ. Kết quả cho thấy phản ứng LAMP cho kết quả dương tính với vi khuẩn *E. coli* O157:H7, âm tính với vi khuẩn *E. coli* ATCC (hình 3). Mặt khác kết quả cho tương đồng khi chúng tôi sử dụng bể ổn nhiệt hay máy PCR (kết quả không được thể hiện trên hình).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng tiến hành kiểm tra 2 phản ứng song song. Một phản ứng chỉ gồm cặp mồi BIP/FIP và một phản ứng

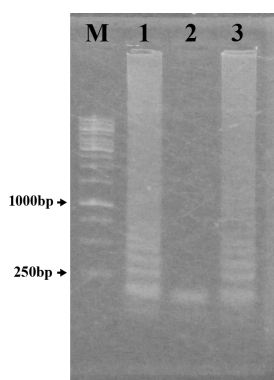
gồm 2 cặp mồi BIP/FIP và cặp mồi loop. Sản phẩm sau đó được điện di trên gel agarose 1%.

Kết quả cho thấy không có sự khác nhau giữa hai phản ứng này (hình 3).



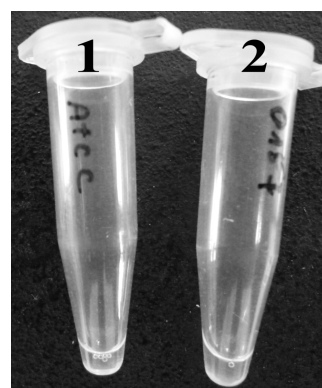
Hình 2. Tách chiết DNA tổng số

1. *E. coli* O157:H7;
2. *E. coli* ATCC.



Hình 3. Kết quả phản ứng LAMP

- M. Marker 1kb; 1. *E. coli* O157:H7 với 1 cặp mồi; 2. *E. coli* ATCC; 3. *E. coli* O157:H7 với 2 cặp mồi.



Hình 4. Sản phẩm LAMP khi nhuộm SYBR Green I

1. *E. coli* ATCC;
2. *E. coli* O157:H7.

Phát hiện sản phẩm LAMP

Cách đơn giản nhất để phát hiện sản phẩm phản ứng LAMP điện di trên gel agarose 1%. Theo lý thuyết, kết quả phản ứng sẽ cho nhiều băng có kích thước khác nhau được điện di trên gel agarose. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi hoàn toàn phù hợp với lý thuyết. Tương tự như điện di, chúng tôi thêm trực tiếp EtBr vào 2 ống thử phản ứng, sau đó soi dưới tia UV. Những mẫu dương tính sẽ phát quang, còn những ống âm tính độ sáng sẽ kém hơn (do còn DNA mẫu và DNA mồi) (Kết quả không được thể hiện trên hình). Một cách phát hiện sản phẩm LAMP bằng mắt thường là sử dụng SYBR Green I. Phản ứng sau khi diễn ra, chúng tôi bổ sung thêm 1% SYBR Green I. Những mẫu nào dương tính sẽ cho màu xanh, còn mẫu nào âm tính sẽ cho màu vàng chanh (hình 4).

KẾT LUẬN

Như vậy, phản ứng LAMP hoàn toàn có thể xảy ra khi chỉ sử dụng duy nhất một cặp mồi BIP/FIP. Phương pháp này có thời gian tiến hành phân tích kết quả nhanh và chính xác, trong khi đó kỹ thuật, hóa chất và thiết bị đơn giản, vì vậy, có thể thấy đây là một trong những hướng tạo kit phát hiện nhanh trong điều kiện làm việc chưa

được tốt như hiện nay ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Fei W., Lin J., Beilei G., 2011. Loop-mediated Isothermal Amplification Assays for Detecting Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* in Ground Beef and Human Stools. *J Clin Microbiol*, 49(12): 91-97w.
2. Griffin P. M. and Tauxe R. V., 1991. The epidemiology of infections caused by *E. coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev*, 13: 60-98.
3. Maruyama F., Kenzaka T., Yamaguchi N., Tani K., Nasu M., 2003. Detection of Bacteria Carrying the *stx2* Gene by In Situ Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Appl Environ Microbiol*, 69(8): 5023-5028.
4. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 28(12): 7.
5. Rasekh J., Thaler A. M., Engeljohn D. L., Pihkala N. H., 2005. Food Safety and Inspection Service Policy for Control of Poultry Contaminated by Digestive Tract

- Contents: A Review. J Appl Poult Res, 14: 603-611.
6. Sambrook J. and Russel D. W., 2001. Molecular cloning: A laboratory manual 3rd ed. NY.
 7. Thekiso O. M., Bazie R. S., Coronel-Servian A. M., Sugimoto C., Kawazu S., Inoue N., 2009. Stability of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) reagents and its amplification efficiency on crude trypanosome DNA templates. J Vet Med Sci, 71(4): 471-475.
 8. Yukiko Hara-Kudo, Jiro Nemoto, Kayoko Ohtsuka, Yuko Segawa, Kosuke Takatori, Tadashi Kojima, Masanari Ikedo, 2007. Sensitive and rapid detection of Vero toxin-producing Escherichia coli using loop-mediated isothermal amplification. J Med Microbio, 56: 398-406.
 9. [Http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/index.html](http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/index.html).

DEVELOPMENT OF A LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION ASSAY FOR RAPID DETECTION OF *Escherichia coli* O157: H7 BACTERIA

Hoang Phu Hiep¹, Le Quang Huan²

⁽¹⁾Thai Nguyen University of Education, TNU

⁽²⁾Institute of Biotechnology, VAST

SUMMARY

Escherichia coli O157:H7 is a significant cause of foodborne illnesses and deaths in worldwide. A rapid and sensitive detection technique, which required to detect *E. coli* O157:H7 in foods, is the important and indispensable. Shiga toxin 2 (encoded by *stx2*) is important virulence factor for STEC strains and *E. coli* O157:H7 bacteria, therefore *stx2* gene is the target gene for many detection techniques. In this study, we developed the loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid and sensitive detection of *E. coli* O157:H7 strains. The method advantages include rapidity, sensitivity and minimal equipment requirement. Primers were specially designed for founding on *stx2* gene. The LAMP reaction carries out in the thermocycler or waterbath. We recognize no difference when used only inner primers (BIP/FIP) or 4-6 primers. A positive reaction was visualized when used SYBR green stain or under UV light.

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7, LAMP, *stx2* gene, FIP, BIP.

Ngày nhận bài: 3-4-2012