

KHẢO SÁT ĐỘT BIẾN Ở GIEN *PBP2B* LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH KHÁNG THUỐC KHÁNG SINH Ở *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

ĐỖ THANH NGÂN, NGUYỄN HOÀNG CHƯƠNG
THÁI KẾ QUÂN, HỒ HUỖNH THÙY DƯƠNG

Trường đại học Khoa học tự nhiên
Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh

Streptococcus pneumoniae là một trong những tác nhân chính gây bệnh viêm màng não mủ và viêm đường hô hấp, viêm xoang mũi ... Trong những năm 1940, các chủng *S. pneumoniae* phân lập được đều nhạy cảm với thuốc kháng sinh penixillin nên thuốc này được chỉ định dùng trong điều trị bệnh do nhiễm phế cầu khuẩn. Trường hợp kháng penixillin đầu tiên ở *S. pneumoniae* được ghi nhận ở Nam Phi vào năm 1977 [1].

Ở Việt Nam, tình trạng dùng thuốc kháng sinh không kiểm soát, không theo chỉ dẫn của bác sĩ đã làm tăng nhanh hiện tượng kháng thuốc kháng sinh ở nhiều loại vi khuẩn trong những năm gần đây. Nghiên cứu về tình hình kháng thuốc của một số vi khuẩn ở người khỏe mạnh tại cộng đồng năm 1999 (tại ba địa điểm ngoại thành Hà Nội, Huế và thành phố Hồ Chí Minh) cho thấy tỷ lệ người khỏe mạnh mang vi khuẩn *S. pneumoniae* có độc lực là 40,1% ở Hà Nội, 16,7% ở Huế và 30,9% tại thành phố Hồ Chí Minh. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy tỷ lệ *S. pneumoniae* đa kháng ở thành phố Hồ Chí Minh cao hơn hẳn ở Huế và Hà Nội (53% so với 16% ở Hà Nội và 32,1% ở Huế). Tính nhạy cảm với penixillin của *S. pneumoniae* đã giảm đi 19,6%, tính chung cho cả 3 địa phương này.

Sự đề kháng penixillin của *S. pneumoniae* do sự biến đổi trên các gen *pbp*, mã hóa cho các protein gắn với penixillin (penicillin binding protein - PBP) trên màng tế bào vi khuẩn. Các biến đổi này làm thay đổi cấu trúc của các PBP khiến khả năng liên kết của chúng đối với các thuốc kháng sinh họ lactam giảm đi. Vì vậy, vi khuẩn trở nên ít hoặc không bị tác động bởi các thuốc kháng sinh này [1].

Chúng tôi dùng kỹ thuật PCR để nhân bản

một số trình tự của gen *pbp2b*, sau đó dùng kỹ thuật SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) để phát hiện các trình tự có mang đột biến.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Chủng vi khuẩn

20 chủng vi khuẩn *S. pneumoniae* kháng penixillin, 1 chủng vi khuẩn nhạy penixillin và chủng *S. pneumoniae* ATCC 49619 sử dụng trong đề tài nghiên cứu này được cung cấp bởi khoa vi sinh, bệnh viện Nhi Đồng I và khoa vi sinh, bệnh viện Chợ Rẫy, Tp. Hồ Chí Minh.

2. Phương pháp

a) Phương pháp PCR

3 μ l ADN vi khuẩn tách chiết theo phương pháp đun sôi được dùng làm bản mẫu cho phản ứng PCR. Thể tích của phản ứng là 25 μ l có chứa 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH = 8, 1,5 mM MgCl₂, 12,5 pmol mỗi loại mỗi P5 và P6 [1], 200 nM mỗi loại deoxyribonucleotit (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 1,5 U Taq DNA polymeraza (promega). Chương trình PCR được thiết lập như sau : 93°C trong 3 phút; tiếp theo là 30 chu kỳ bao gồm: 93°C-1 phút, 55°C-1 phút, 72°C-1 phút; cuối cùng là 72°C-5 phút. Sản phẩm tạo ra có kích thước 684 bp (cặp base).

Để phục vụ cho kỹ thuật SSCP - kỹ thuật này chỉ phân tích hiệu quả các trình tự ADN có kích thước dưới 400 bp, chúng tôi thiết kế các môi "trong" nhằm nhân bản những đoạn có kích thước theo yêu cầu từ trình tự 684 bp nói trên. Các cặp môi được thiết kế bằng các phần mềm Clustal X, Annhyb. Trình tự các môi và kích

thước của các sản phẩm PCR tương ứng được trình bày trong bảng sau:

| Tên môi | Trình tự | Kích thước sản phẩm PCR |
|---------|-----------------------------------|-------------------------|
| P5 | 5'- CTGACCATTGATTTGGCTTTCCAA – 3' | 331 cặp base (đoạn 2B1) |
| P22 | 5'- GAGCTGAACCTTGAAGACG – 3' | |
| P23 | 5'- CGTCTTCCAAGGTTTCAGCTC – 3' | 130 cặp base (đoạn 2B2) |
| P24 | 5'- CATGATTCCAAGAGCGGTTT – 3' | |
| P25 | 5'- GGCCAGACCTATCAACCAAA – 3' | 242 cặp base (đoạn 2B3) |
| P6 | 5'- TTTGCAATAGTTGCTACATACTG – 3' | |

Sản phẩm 684 bp được pha loãng 100 lần; 3 µl được sử dụng làm bản mẫu cho phản ứng PCR. Phản ứng PCR được tiến hành với các thành phần phản ứng và chương trình đã nêu ở phần trên. Các sản phẩm PCR sau đó được phân tích bằng điện di trên gel agarosa 1%.

b) Phương pháp SSCP

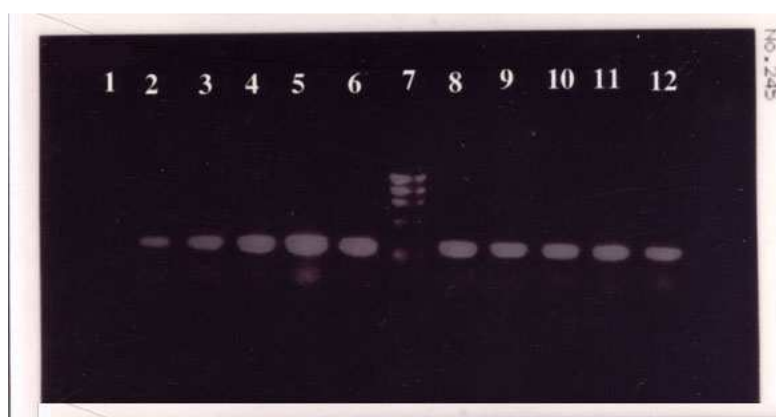
Khi được điện di trong gel không biến tính, mỗi mạch đơn DNA sẽ nhận một cấu hình đặc trưng được quy định bởi trình tự nucleotit. Sự thay đổi của chỉ một base trong trình tự cũng làm thay đổi cấu hình này, dẫn đến sự di chuyển không giống nhau trong quá trình điện di. Chúng tôi phát hiện sự hiện diện của các đột biến trên DNA bằng phương pháp này. Các sản phẩm PCR được biến tính bằng cách đun ở 100°C trong 5 phút rồi làm lạnh đột ngột. Sau đó

ADN biến tính được điện di trên gel polyacrylamit 8%. Quá trình điện di được tiến hành trong 12-14 giờ với hiệu thế 120V ở 4°C. Sau điện di, gel được nhuộm bạc để xác định vị trí của các vạch tương ứng với ADN mạch đơn [2, 3, 4].

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kiểm tra hiệu quả nhân bản các trình tự 2B1, 2B2, 2B3

Chúng tôi sử dụng kỹ thuật PCR để khuếch đại các trình tự 2B1, 2B2, 2B3 từ gen *pbp2b* của 20 chủng vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae* kháng penicillin. Kết quả điện di các sản phẩm khuếch đại của vài chủng trên gel agarosa 1% được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Kết quả điện di trên gel agarosa các trình tự của gen *pbp2b* được nhân bản bằng PCR

1: thang phiX-174 HaeIII

2: mẫu chứng âm

3, 4, 5: các đoạn 2B1, 2B2, 2B3 của chủng *S. pneumoniae* SR15

6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14: các đoạn tương ứng của chủng *S. pneumoniae* SR20, SR25, SR30.

Kết quả trên cho thấy ở cả 4 chủng *S. pneumoniae* thử nghiệm đều có sự xuất hiện của các sản phẩm PCR có kích thước như dự kiến

lần lượt là 331bp, 130bp và 242bp. Điều này chứng tỏ các cặp môi chúng tôi thiết kế đã hoạt động tốt.

Để kiểm tra tính đặc hiệu của sản phẩm PCR, chúng tôi tiến hành lai phân tử (Southern blotting) các sản phẩm PCR với mẫu dò đánh dấu bằng DIG-dUTP. Mẫu dò là sản phẩm 2B3 của chủng *S. pneumoniae* ATCC 49619 đã được xác định trình tự và so sánh với các trình tự trong GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>). Kết quả cho phép khẳng định tính đặc hiệu của các sản phẩm

PCR thu được (kết quả không trình bày).

2. Kết quả phân tích bằng kỹ thuật SSCP các trình tự *pbp* 2B1, 2B2, 2B3 của 20 chủng *S. pneumoniae* kháng penicillin

Vài kết quả tiêu biểu phân tích đoạn 2B1 trên 7 chủng kháng có đối chiếu với chủng nhạy được trình bày trong hình 2.



Hình 2. Kết quả điện di trên gel polyacrylamit trình tự 2B1 từ một số chủng kháng và nhạy với penicillin

1: ADN không biến tính

2: đoạn 2B1 của chủng *S. pneumoniae* nhạy

3-9: đoạn 2B1 của các chủng *S. pneumoniae* kháng SR25, SR15, SR26, SR18, SR22, SR20, SR23

Kết quả trên cho thấy có 4 dạng điện di khác nhau, tạm gọi là dạng I, II, III, IV của trình tự 2B1 trên 7 chủng khảo sát. Dạng I bao gồm chủng SR25 (giếng 3) và SR26 (giếng 5), dạng II bao gồm chủng SR15, SR18, SR22 (giếng 4,6,7), dạng III có chủng SR20 (giếng 8) và dạng IV có chủng SR20 (giếng 9).

Các kết quả trên cả 3 đoạn 2B1, 2B2, 2B3 ở 20 chủng khảo sát cho thấy có 7 dạng điện di

khác nhau đối với đoạn 2B1, 4 dạng điện di đối với đoạn 2B2 và 5 dạng điện di đối với đoạn 2B3. Các dạng điện di khác nhau này phản ánh sự hiện diện của ít nhất 1 đột biến điểm trên mỗi trình tự khảo sát.

Tổng kết trên cả 3 trình tự khảo sát đối với từng chủng kháng, chúng tôi thu được kết quả như sau:

| Sự xuất hiện đột biến trên 3 trình tự 2B1, 2B2, 2B3 của gen <i>pbp2b</i> | Chủng vi khuẩn |
|--|------------------------|
| Không có đột biến trên cả 3 trình tự | 33, 34 |
| Chỉ xảy ra trên trình tự 1 | 15, 22, 23, 24 |
| Chỉ xảy ra trên trình tự 2 | 25, 27, 28 |
| Chỉ xảy ra trên trình tự 3 | 26, 29 |
| Xảy ra trên trình tự 1 và 2 | 18, 29 |
| Xảy ra trên trình tự 1 và 3 | 32 |
| Xảy ra trên cả 3 trình tự | 16, 17, 19, 21, 30, 31 |

Số lượng lớn các dạng điện di khác nhau trên một trình tự tương đối ngắn cho thấy đây là một vùng biến động cao. Điều này phù hợp với các công bố trước đây cho thấy trình tự ADN của gen *pbp2b* ở *S. pneumoniae* nằm giữa hai môi P5 và P6 tương ứng với vùng mã hóa cho hoạt tính transpeptidaza là vùng thường xuyên xảy ra các đột biến [1]. Các đột biến này có thể ảnh hưởng hoặc không ảnh hưởng đến cấu trúc của PBP. Chỉ những đột biến làm thay đổi cấu trúc của PBP2B mới có thể làm thay đổi tính kháng của vi khuẩn. Trong phần nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi sẽ tiến hành xác định các đột biến này.

III. KẾT LUẬN

Kỹ thuật SSCP sử dụng trong bài này cho phép phát hiện sự hiện diện của các đột biến điểm trên 3 trình tự nhân bản từ gen *pbp2b* ở 20 chủng *S. pneumoniae* kháng penicillin. Vùng

trình tự khảo sát là vùng có tính biến động di truyền lớn, thể hiện qua số lượng lớn các dạng điện di SSCP khác nhau ở các chủng kháng thử nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Mignon du Pleissis, Anthony M. Smith, Keith P. Klugman.**, 1998: Journal of Clinical Microbiology, 36: 453-457.
2. **E. P. H. Yap and J. O'D. McGee**, 1994: Non-isotopic single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of PCR products. PCR technology current innovations. CRC Press, 165-177.
3. **Peter Nollau and Christoph Wagener.** 1997: Clinical chemistry, 43: 1114-1128.
4. **Steve E. Humphries et al.**, 1997: Clinical chemistry, 43: 427-435.

POINT MUTATION ANALYSIS OF THE *PBP2B* (PENICILLIN BINDING PROTEIN) GENE IN PENICILLIN RESISTANT *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* STRAINS

DO THANH NGAN, NGUYEN HOANG CHUONG,
THAI KE QUAN, HO HUYNH THUY DUONG

SUMMARY

We amplified three fragments (2B1, 2B2, 2B3) corresponding to the transpeptidase encoding region of *pbp2b* gene in 20 penicillin-resistant strains of *S. pneumoniae* isolated from clinical samples. The fragments were then analysed by SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) electrophoresis.

We identified seven SSCP electrophoretic patterns of 2B1, four of 2B2 and five of 2B3 fragments. This high variation in electrophoretic mobility of these fragments shows the great genetic variation of the studied region. The sequencing of these fragments will confirm our results.

Ngày nhận bài: 15-4-2002