

PHÂN LOẠI CÁC CHỦNG VI KHUẨN *BACILLUS* BẰNG PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ NUCLEOTIT CỦA GIEN 16S-ARN

TÀNG THỊ CHÍNH

Viện Công nghệ môi trường

Trước những năm 90 của thế kỷ XX, các chủng vi khuẩn(VK) được phân loại chủ yếu bằng các khóa phân loại vi sinh vật truyền thống (khóa phân loại của Bergey's manual); người ta dựa vào các đặc điểm hình thái của khuẩn lạc và tế bào, các đặc điểm sinh lý sinh hóa, khả năng sử dụng các nguồn đường của các chủng VK để phân loại. Tuy nhiên, việc phân loại bằng phương pháp này đôi khi không chính xác, đặc biệt là khi phân loại các chủng VK đến loài. Vì các chủng vi sinh vật cùng nhóm thường có rất nhiều đặc điểm giống nhau. Vì vậy, ngày nay, ngoài việc sử dụng phương pháp phân loại truyền thống, các nhà khoa học còn kết hợp với phương pháp sinh học phân tử, phân tích trình tự của gen 16S-ARN để phân loại.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vi sinh vật

Chủng *E.coli* XL1-Blue, plasmid PGEM-T* vectơ mua của hãng Promega, Mỹ.

2. Hóa chất

ProteinazaK, lysozym, clorophoóc, phenol, isoamyl-alcohol, propyl-alcohol,... (Sigma), plasmid extraction Kit và DNA extraction Kit (PREMATT II) của hãng Bioneer-Mỹ.

3. Phương pháp

a. Tách chiết ADN tổng số

Hai chủng VK *Bacillus subtilis* HA401 và IBT012 được nuôi lác qua đêm trên môi trường LB lỏng, sau đó ly tâm để thu sinh khối và tách chiết ADN tổng số theo phương pháp tách chiết ADN [6].

b. Nhân đoạn gen 16S-ARN bằng kỹ thuật PCR

Đoạn gen 16S-ARN của các chủng *Bacillus* được nhân bằng kỹ thuật PCR nhờ sử dụng cặp mồi đặc hiệu có trình tự như sau:

Mồi xuôi GF1: 5'-TAACACATGGAAGTC-GAACG-3'.

Mồi ngược GR1: 5'-GGTGTGACGGGC-GGTCTGTACAAG-3'.

PCR được thực hiện với chu trình nhiệt như sau: 94°C: 5', (94°C: 1', 55°C: 45'', 72°C: 1'') lặp lại 30 chu kỳ; 72°C: 8'. Sản phẩm PCR được bảo quản ở 4°C và được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 1%, nhuộm bản gel với ethidium bromit và xem điện di đồ dưới ánh sáng của đèn cực tím.

Plasmid pGEM-T* được mở vòng bằng enzym EcoRI, điểm cắt của enzym EcoRI sẽ mở vòng plasmid để gắn ADN.

Các kỹ thuật tái tổ hợp và tách chiết ADN plasmid được tiến hành theo Sambrook và cs. [6].

Việc xác định trình tự của gen được tiến hành theo phương pháp chu kỳ nhiệt của hãng Macrogen-Hàn Quốc. Đọc kết quả trình tự của gen trên máy xác định trình tự ADN tự động ABI377DNA. Trình tự của gen được so sánh tại ngân hàng dữ liệu gen NCBI và số liệu được xử lý bằng phần mềm BLAST của NCBI.

Tinh sạch sản phẩm PCR bằng Kit DNA PREMATT II của hãng Bioneer.

c. Gắn đoạn gen 16S-ARN vào plasmid pGEM-T*

Sản phẩm PCR của gen 16S-ARN tinh sạch: X µl.

Véc tơ: pGEM-T: 1 µl; T4-ADN: 1 µl; đệm gắn: 5 µl; nước khử ion thanh trùng: X µl.

Tổng số: 10 µl, giữ ở 14°C trong 16 giờ.

d. *Biến nạp plasmid vào chủng E.coli XL1-Blue* [5]

Lấy 100 µl tế bào khả biến của chủng *E.coli* XL1-Blue bổ sung vào plasmid đã gắn với sản phẩm 16S-ARN, ủ trong 30 phút ở 0°C.

Sốc nhiệt ở 42°C trong 2 phút.

Bổ sung 1 ml môi trường LB ampixilin.

Ủ trong 1 giờ ở 37°C, sau đó ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút; loại bỏ dịch, nhỏ 50-100 µl/petri môi trường thạch LB-ampixilin-Xgal. Nuôi qua đêm ở 37°C.

Tách các khuẩn lạc màu trắng để cấy vào môi trường LB-ampixilin nuôi lắc qua đêm, ly tâm để thu sinh khối. Tách plasmid bằng Plasmid Extraction Kit của hãng Bioneer.

e. *Đọc trình tự nucleotit của đoạn gen 16S-ARN* (3)

Plasmid có gắn đoạn gen 16S-ARN được gửi để đọc trình tự nucleotit tại hãng Macrogen, Hàn.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Phân lập *Bacillus* ưa kiềm sinh tổng hợp α-amylaza

Các chủng *Bacillus* ưa kiềm sinh tổng hợp α-amylaza được phân lập từ các mẫu bùn ở ven biển Cát Bà và Hải Phòng, trên môi trường tinh bột có thành phần như sau: tinh bột tan (Sigma): 0,2%, tripton (Difco): 0,1%, cao men (Difco): 0,2%, KH₂PO₄: 0,2%, MgSO₄.7H₂O: 0,1%, CaCl₂.2H₂O: 0,1%, NaCl: 0,5%, Na₂CO₃: 1,0% (thanh trùng riêng), thạch: 1,5%, pH = 10, nuôi trong tủ ấm ở 37°C, trong 2 ngày. Chúng tôi đã tuyển chọn được một số chủng *Bacillus* ưa kiềm sinh tổng hợp α-amylaza mạnh; hai chủng HA401 và IBT012 được chọn để nghiên cứu phân loại.

2. Phân loại hai chủng *Bacillus* đã tuyển chọn theo khóa phân loại của Bergey's manual 1989 [1]

Kết quả nghiên cứu các đặc điểm hình thái của khuẩn lạc, tế bào, tính chất nuôi cấy của 2 chủng HA401 và IBT012 được trình bày ở bảng 1 và bảng 2.

Bảng 1

Đặc điểm hình thái của khuẩn lạc, tế bào của 2 chủng HA401 và IBT012

Chủng VK	Màu sắc của khuẩn lạc	Bề mặt của khuẩn lạc	Kích thước tế bào (µm)	Nhuộm gram	Tạo bào tử	pH phát triển	
						5,7	6,8
HA401	trắng	khô, nhẵn	3,0 × 1,0	gr ⁺	+	-	+
IBT012	trắng	khô, nhẵn	2,3 × 1,7	gr ⁺	+	-	+

Bảng 2

Đặc điểm sinh lý sinh hóa của 2 chủng HA401 và IBT012

Chủng VK	Hình thành axit từ:				Thủy phân:		
	Glucô	Arabino	Xylo	Mannitol	Tinh bột	Gelatin	Cazein
HA401	+	+	+	+	+	+	+
IBT012	+	+	+	+	+	+	+

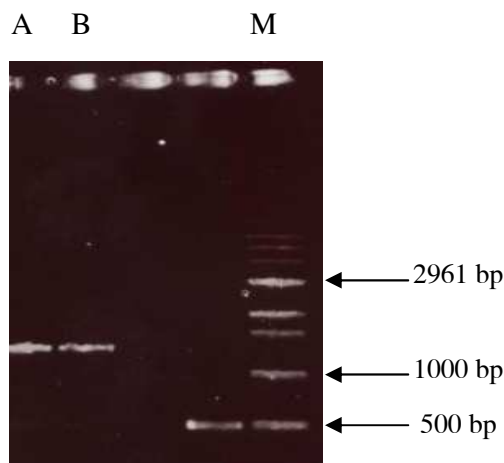
So sánh với các đặc điểm phân loại của các chủng chuẩn của các nhóm VK gram⁺ của khóa phân loại chi *Bacillus* của Bergey cho thấy 2 chủng VK đã tuyển chọn đều thuộc chi *Bacillus*.

3. Tách chiết ADN tổng số, khuếch đại đoạn gen 16S-ARN bằng phản ứng PCR

ADN tổng số của 2 chủng HA401 và IBT012 được tách và làm sạch bằng phương

pháp tách chiết ADN ribôxôm của các chủng *Bacillus*.

Sau đó, sử dụng cặp mồi GF1 và GR1 đã thiết kế để khuếch đại đoạn gen 16S-ARN của các chủng *Bacillus* bằng phản ứng PCR với 50 ng ADN tách từ các chủng *Bacillus*. Trên điện di đồ, sản phẩm là 1 băng ADN có phân tử lượng khoảng 1300 bp nhìn thấy trên gel agarosa 1% (hình1).



Hình1. Phổ điện di của sản phẩm PCR 16S-ARN

M. thang ADN chuẩn; A, B. sản phẩm PCR của 2 chủng HA401 và IBT012.

4. Tách dòng và biến nạp plasmit vào chủng *E.coli XLI-Blue*

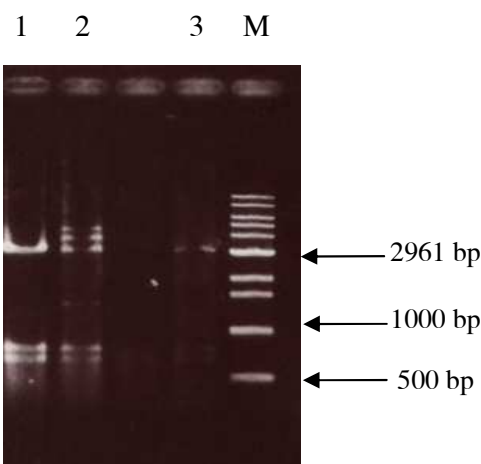
Sau khi khuếch đại đoạn gen 16S-ARN bằng phản ứng PCR, sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit DNA PREMATT II.

Vectơ pGEM-T* của hãng Promega là một loại vectơ plasmit tách dòng có kích thước khoảng 2,961 kb, là một vectơ rất dễ gắn các sản phẩm ADN lạ. Phản ứng ghép nối của sản phẩm PCR 16S-ARN với vectơ pGEM-T* diễn ra ở 14°C, là nhiệt độ thích hợp cho sự hoạt động của enzym T4-DNA ligaza gắn các điểm nối trên sợi ADN. Các khả năng bất cập có thể xảy ra trong quá trình ghép nối là một đoạn sản phẩm PCR nối với plasmit là tạo ra sản phẩm lai như mong muốn, hoặc các sản phẩm ADN tự nối với nhau, hoặc các plasmit tự nối với nhau.

Sản phẩm lai này được biến nạp vào chủng *E.coli XLI-Blue* [3, 4]. Các tế bào sau khi biến

nạp, được cấy trải trên đĩa thạch chứa môi trường LB có bổ sung ampicilin và X-gal, nuôi qua đêm ở 37°C và sau đó chọn các khuẩn lạc có màu trắng để cấy vào môi trường LB ampicilin lỏng, nuôi lắc trong 12 giờ ở 37°C. Ly tâm để thu sinh khối, sau đó tách plasmit bằng kit Plasmid Extraction. Plasmit tinh sạch được cắt bằng enzym EcoRI để kiểm tra kết quả biến nạp. Kết quả biến nạp của các khuẩn lạc sau khi tách plasmit và cắt bằng enzym EcoRI được kiểm tra bằng điện di agarosa 1,0% (hình 2).

Kết quả kiểm tra khả năng gắn đoạn gen 16S-ARN vào plasmit của 2 chủng HA401 và IBT012 (1, 2 hình 2). Các plasmit trên đã gắn được đoạn gen 16S-ARN, nên khi cắt bằng enzym EcoRI cho 3 đoạn: đoạn có kích thước lớn nhất 2961 bp là ADN của plasmit pGEM-T* khi được mở vòng bằng EcoRI. Còn 2 đoạn ngắn hơn, tổng kích thước của chúng tương đương với sản phẩm PCR của đoạn gen mã hóa 16S-ARN khoảng 1,3 kb. Các plasmit có gắn đoạn gen 16S-ARN được gửi đi để xác định trình tự nucleotit tại hãng Macrogen của Hàn Quốc.



Hình 2. Plasmit gắn đoạn gen 16S-ARN cắt bằng EcoRI của 2 chủng HA401 và IBT012

1, 2. plasmit + gen 16S-ARN bị cắt hoàn toàn;
3. plasmit không gắn được gen 16S-ARN.

5. Xác định trình tự nucleotit

Kết quả đọc trình tự của đoạn gen mã hóa 16S-ARN của 2 chủng HA401 và IBT012 được đọc trên máy ABI377DNA và phân tích số liệu bằng phần mềm BLAST của NCBI, được trình bày ở hình 3 và hình 4.

BASE COUNT 356 a 336 c 434 g 283 t

ORIGIN

1	cgccgcggg	aattcgattt	aacacatgca	agtccaacgg	acagatggga	gcttctccc
61	tgatgttagc	ggcggacggg	tgagtaacac	gtgggtaacc	tgccgtgaag	actgggataa
121	ctccgggaaa	ccggggctaa	taccggatgg	ttgttgaac	cgcatggttc	aaacataaaa
181	ggtgcttcg	gctaccactt	acagatggac	ccgcggcgca	ttagctagtt	ggtgaggtaa
241	cggtcacca	aggcgacgat	gcgtagccga	cctgagaggg	tgatcgcca	cactgggact
301	gagacacggc	ccagactcct	acgggagga	gcagtaggga	atctccgca	atggacgaaa
361	gtctgacgga	gcaacgccgc	gtgagtgatg	aaggtttctg	gatcgtaaag	ctctgtttt
421	agggaagaac	aagtaccgtt	cgaatagggc	ggtacctga	cggtacctaa	ccagaaagcc
481	acggtaact	acgtgccagc	agcccggtta	atactaggtt	ggcaagcgtt	gtccggaatt
541	attggcgta	aagggtctgc	aggcggttct	ttaagtctga	tgtgaaagcc	cccggctcaa
601	ccggggaggg	tcattggaaa	ctggggaact	tgagtgcaga	agaggagagt	ggaattccac
661	gttagcgggt	gaaatgcgta	aagatgtgga	ggaacaccag	tggcgaagcg	gactctctgg
721	tctgtaactg	acgcttagga	accgaaagcg	tggggagcga	acaggattag	ataccctggt
781	agtccacccc	ggtaaacgat	gagtgtctaa	tgttaggggg	ttccgcccc	ttagtctgct
841	agtaacgca	ttaagcactc	cgcttgggga	gtacggtcgc	aagactgaaa	ctcaaaggaa
901	ttagcggggg	cccgcacaag	cggtggagca	tgtggttaa	ttagaagcaa	cgcaagaac
961	cttaccaggt	cttgacatcc	tctgacaatc	ctagagatag	gacgtcccct	tcgggggacg
1021	agtacaggt	ggtgcatggt	tgtctcagc	tcgtgtctgt	agatgttggg	ttaagtcccc
1081	caacgagcgc	aaccctgat	cttagttgcc	agcattcagt	tgggcactct	aaggtgactg
1141	ccgtgacaaa	accggaggaa	ggtggggatg	acgtcaaatc	atcatgcccc	ttagtactctg
1201	ggctacacac	gtgctacaat	ggacagaaca	aagggcagcg	aaaccgcgag	gtaagccaa
1261	tcccacaaat	ctgttctcag	ttaggtcgc	agtctgcaac	tcgactcgtt	gaagctggaa
1321	tcgctagtaa	tcgcgatca	gcattccgcg	gtgaatacgt	tcccgggctt	tgtacacacc
1381	gcccgtcaca	ccaatcact	agtgaattc			

Hình 3. Trình tự nucleotit của đoạn gen 16S-ARN của chủng *Bacillus* IBT012

1	tacaaggccc	gggaacgtat	tcaccgcggc	atgctgatcc	gcgattacta	gcgattccag
61	cttccacgag	tcgagttgca	gactgcgatc	cgaactgaga	acagatttgt	gggattggct
121	taacctcgcg	gtttcgtctc	cctttgttct	gtccattgta	gcacgtgtgt	agccccaggtc
181	ataaggggca	tgatgatttg	acgtatcccc	caccttctc	cggtttgtca	ccggcagtca
241	ccttagagtg	cccaactaaa	tgtctggcaac	taagatcaag	ggttgcgctc	gttgcgggac
301	ttaaccacac	atctcacgac	acgagctgac	gacaacctag	caccacctgt	cactctgccc
361	ccgaagggga	cgctctatct	claggattgt	cagaggatgt	caagacctgg	taagttctt
421	cgcgttgctt	cgaaltaaac	cacatgtctc	accgcttgtg	cgggcccccg	tcaattcctt
481	tgagttcag	tcttgcgacc	gtactcccca	ggcggagtgc	ttaatgcgtt	agctgcagca
541	ctaaggggcg	gnaaaccccc	taacacttag	cactcatcgt	ttagcgcggg	ggactaccag
601	ggtatclaat	cctgttctgt	ccccacgctt	tcgcttctca	gcgtcagfta	cagaccaaaa
661	gagtcgctt	cgccactggt	gttctccac	atctttacgc	atttcaccgc	tacacgtgga
721	attccactct	cctcttctgc	actcaagttc	cccagtttcc	aatgaccctc	cccggttgag
781	ccgggggctt	tcacatcaga	cltaagaaac	cgcttgcgag	ccctttacgc	ccaataatlc
841	cggacaacgc	ttgccacctc	cgtattaccg	cggctgctgg	cacgtagtta	gccgtggctt
901	tctggttagg	taccgtcaag	gtaccgccct	attcgaacgg	tacttgttct	tccttaacaa
961	cagagcttta	cgatccgaaa	acctcatca	ctcacgcggc	gttgcctcgt	cagactttcg
1021	tccattgagg	aagattccct	actgtctcct	cccgtaggag	tctgggcccgt	gtctcagttc
1081	cagtggtggc	gatcaccttc	tcaggtcggc	lacgcatcgt	cgcttgggtg	agccgttacc
1141	tcaccaacta	gctaatgcgc	cgcgggtcca	tctgtaagtg	glagccgaag	ccacctttta
1201	tgtttgaacc	atgcggttca	aacaacctc	cggatttagc	cccggtttcc	cggagttata
1261	ccagctttac	aggcaggcta	cccacgtgtt	actcacccgt	ccggcgctaa	catcaggggag
1321	caagctccca	tctgtccgtt	cgacttgcac	gtgttaaatc	gaattcccgc	ggcc

Hình 4. Trình tự nucleotit của đoạn gen 16S-ARN của chủng *Bacillus* HA401

Từ kết quả đọc trình tự của gen 16S-ARN của 2 chủng *Bacillus* đã tuyển chọn và so sánh với các dữ liệu của ngân hàng gen của NCBI-Mỹ cho thấy trình tự nucleotit của gen 16S-ARN của chủng IBT012 có 98% tương đồng với trình tự nucleotit của gen 16S-ARN của chủng *Bacillus subtilis* 2633 và trình tự nucleotit của gen 16S-ARN của chủng HA401 có 97% tương đồng với trình tự nucleotit của gen 16S-ARN của chủng *Bacillus subtilis* 2633. Từ kết quả trên, có thể khẳng định 2 chủng *Bacillus* ưa kiềm HA401 và IBT012 phân lập được đều thuộc loài *Bacillus subtilis*.

Trình tự nucleotit của gen 16S-ARN của chủng *Bacillus subtilis* HA401 được công bố tại ngân hàng gen NCBI và có mã số AY279207.

III. KẾT LUẬN

1. Hai chủng VK ưa kiềm HA401 và IBT012 được phân lập từ các mẫu bùn ở ven biển Cát Bà và Hải Phòng, có khả năng sinh tổng hợp α -amylaza kiềm. Kết quả phân loại bằng việc nghiên cứu các đặc điểm sinh học cho thấy chúng thuộc chi VK *Bacillus*.

2. Kết quả phân tích trình tự của gen 16S-ARN của 2 chủng được xử lý bằng phần mềm Blast của NCBI cho thấy trình tự nucleotit của gen 16S-ARN của chủng IBT012 có 98% tương đồng với trình tự nucleotit của gen 16S-ARN

của chủng *Bacillus subtilis* 2633 và trình tự nucleotit của gen 16S-ARN của chủng HA401 có 97% tương đồng với trình tự nucleotit của gen 16S-ARN của chủng *Bacillus subtilis* 2633. Như vậy hai chủng VK ưa kiềm HA401 và IBT012 đều thuộc loài *Bacillus subtilis*.

3. Trình tự nucleotit của gen 16S-ARN của chủng *Bacillus* HA401 được công bố tại ngân hàng gen NCBI, có mã số: AY279207.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Ara K. et al.**, 1992: Bisci. Biotechnol. Biochem. 56: 62-65.
2. **Horikoshi K.**, 1971: Agric. Biol. Chem., 35: 1783-1791.
3. **Igarashi K. et al.**, 1998: J. Appl. and Envir. Microb., 64(9): 3282-3289.
4. **Phillip Gerhardt et al.**, 1994: Method for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D. C. USA.
5. **Jeffrey H. Miller**, 1992: A short course in bacteriol genetics. A Laboratory Manual and Handbook for E. Coli and related, Cold Spring harbor laboratory press, USA.
6. **Sambrook J., Fritsch E. F., T. Maniatis J.**, 1989: Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.

TAXONOMY OF ALKALOPHILIC *BACILLUS* STRAINS BY ANALYSING THE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE 16S-RNA GENE

TANG THI CHINH

SUMMARY

Two alkalophilic *Bacillus* strains HA401 and IBT012, which produced alkaline α -amylase, were isolated from the Catba and Haiphong sea sides. The identification by classical method showed that they belonged to the genus *Bacillus*.

The nucleotide sequence of the 16S-RNA gene of these two strains showed that the one of the strain *Bacillus* IBT012 had 98% homology with the one of the strain *Bacillus subtilis* 2633 and the one of the strain *Bacillus* HA401 had 97% homology with the one of the strain *Bacillus subtilis* 2633. Therefore, these two isolated strains belonged to the species *Bacillus subtilis*.

The nucleotide sequence of the 16S-RNA gene of the strain *Bacillus* HA401 was submitted to the NCBI genbank database with the genbank accession number: AY279207.

Ngày nhận bài: 13-05-2005