

THIẾT KẾ VÀ TỐI ƯU HÓA PHẢN ỨNG MULTIPLEX PCR CHẨN ĐOÁN ĐỒNG THỜI VI KHUẨN THAN VÀ VI KHUẨN DỊCH HẠCH

Nguyễn Thái Sơn¹, Nguyễn Văn An¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu này tiến hành thiết kế và tối ưu hóa phản ứng multiplex PCR sử dụng 6 cặp mồi khuếch đại các gen đích *VrrA*, *pagA*, *capA* và *ypo2088*, *pla*, *cafI* chẩn đoán đồng thời *B. anthracis* và *Y. pestis* trên các chủng đã xác định có đầy đủ plasmid độc. Đây là cơ sở cho việc chế tạo kit multiplex PCR chẩn đoán đồng thời *B. anthracis* và *Y. pestis* từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng và môi trường.

Đối tượng và phương pháp: Chủng vi khuẩn than và dịch hạch được lưu giữ tại Học viện Quân y đã được xác định là có đủ các plasmid chứa các gen độc của hai vi khuẩn. Các cặp mồi sử dụng để phát hiện các gen *VrrA*, *capA*, *pagA* của *B. anthracis* và các gen *ypo 2088*, *pla*, *cafI* của *Y. pestis* được thiết kế dựa trên trình tự gen đã được công bố trên Genbank. Chủng vi khuẩn sau khi được bất hoạt bằng nhiệt, tiến hành tách chiết theo thường qui của bộ kit QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Đức). Tối ưu hóa phản ứng multiplex PCR để đảm bảo phát hiện được đồng thời các gen đích quan tâm bằng cách tối ưu hóa thành phần và chu trình nhiệt của phản ứng.

Kết quả và kết luận: Thiết kế và tối ưu hóa thành công phản ứng multiplex PCR chẩn đoán đồng thời vi khuẩn than và dịch hạch sử dụng 6 cặp mồi được thiết kế để khuếch đại 6 gen đích của 2 vi khuẩn trong đó 2 gen trên chromosome (*VrrA*, *ypo2088*) và 4 gen trên plasmid (*capA*, *pagA*, *pla*, *cafI*).

*Từ khóa: *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, multiplex PCR

ESTABLISHING A NOVEL MULTIPLEX PCR TO DETECT SIMULTANEOUSLY BACILLUS ANTHRACIS AND YERSINIA PESTIS

SUMMARY

Objective: The study aimed to establish a novel multiplex PCR by using six new specific primer pairs targeting to the *VrrA*, *pagA*, *capA* and *ypo2088*, *pla*, *cafI* genes of

⁽¹⁾ Học viện Quân y 103

Người phản hồi (Corresponding): Nguyễn Văn An (ank59hvqy@gmail.com)

Ngày nhận bài: 24/3/2015; Ngày phản biện đánh giá: 23/4/2015

B. anthracis and *Y. pestis*. The assay then was used to develop a multiplex PCR kit for simultaneously detecting *B. anthracis* and *Y. pestis* which carried toxic plasmid genes from clinical and environment samples.

Method: *B. anthracis* and *Y. pestis* strains determined to carry plasmid toxic genes were used. Six specific primer pairs were designed by using Prime3 software basing on reference sequences retrieved from GenBank. After heat inactivation, DNA from bacteria was extracted by using QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Germany) following the manufacturer's instructions, subsequently stored at -80°C until use. The PCR components and temperature cycle were optimized to ensure the simultaneous detection of target genes.

Findings and conclusion: We succeeded to establish a novel multiplex PCR simultaneously detecting *B. anthracis* and *Y. pestis*. Six specific primer pairs were able to amplify target genes of two bacteria including two chromosome genes (*VrrA*, *ypo2088*) and four plasmid genes (*capA*, *pagA*, *pla*, *cafI*).

*Key words: *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, multiplex PCR

ĐẶT VẤN ĐỀ

Khủng bố sinh học đã được đặt ở mức quan tâm hàng đầu của an ninh thế giới, đặc biệt từ sau vụ khủng bố bằng vi khuẩn than (*Bacillus anthracis*) tại Mỹ năm 2001, tiếp theo là việc xác định được vi khuẩn dịch hạch (*Yersina pestis*) trên hai người tại Mỹ năm 2002 [5], [9]. Trong một vụ tấn công nghi ngờ có khủng bố sinh học, việc phát hiện nhanh tác nhân sinh học là một trong những yếu tố quyết định đến an ninh quốc gia. Việc sàng lọc nhanh những mẫu nghi ngờ sẽ giúp kiểm soát sự lây lan và đảm bảo điều trị chính xác mầm bệnh. Hiện nay, trong các phương pháp chẩn đoán *B. anthracis* và *Y. pestis* thì PCR (polymerase chain reaction) là phương pháp có độ nhạy, độ đặc hiệu cao và thời gian cho kết quả nhanh [6], [7]. Các nghiên cứu trước đây ở trong nước chủ yếu tập trung thiết kế phản ứng PCR chẩn đoán từng loại vi khuẩn than hoặc vi khuẩn dịch hạch [1], [2], [3], điều này dẫn đến mất nhiều thời gian và tốn kém mới có thể xác định được

mầm bệnh vì phải tiến hành nhiều phản ứng PCR. Xuất phát từ những vấn đề trên chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm thiết kế và tối ưu hóa phản ứng multiplex PCR chẩn đoán nhanh, chính xác đồng thời cả hai vi khuẩn than và dịch hạch.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Chủng vi khuẩn nghiên cứu: Các chủng vi khuẩn *Bacillus anthracis* và *Yersina pestis* được lưu giữ tại Học viện Quân y đã được xác định có đủ các plasmid chứa các gen độc và chủng vi khuẩn đối chứng (*Echerichia coli*, *Bacillus cereus*) được đặt mua tại công ty Microbiologics (Mỹ).

2. Các cặp mồi: Các cặp mồi sử dụng để phát hiện các gen *VrrA*, *capA*, *pagA* của *B. anthracis* và các gen *ypo 2088*, *pla*, *cafI* của *Y. pestis* được thiết kế dựa trên trình tự gen đã được công bố trên Genbank, các cặp mồi có trình tự như sau:

Bảng 1. Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Gen đích	Vị trí gen	Mồi	Trình tự	Sản phẩm (bp)
VrrA	Chromosome vi khuẩn than	F R	5' CTGTAAGCCCTGTCGTCGAA 3' 5' CCTCGCGCACTTCTTTTTTCT 3'	222
pagA	Plasmid pOX1 vi khuẩn than	F R	5' AAATGGAGCACGGCTTCTGA 3' 5' AGCCTGTATCCACCCTCACT 3'	751
capA	Plasmid pOX2 vi khuẩn than	F R	5' TGACGATGACGATGGTTGGT 3' 5' GCTTCCTGTCTAGGACTCGG 3'	610
ypo2088	Chromosome vi khuẩn dịch hạch	F R	5' GGATGAGATAACGCGGGTGT 3' 5' AGAGAATCGTGATGCCGTCC 3'	103
pla	Plasmid pPCP1 vi khuẩn dịch hạch	F R	5' CGGGATGCTGAGTGGAAAGT 3' 5' ATTACCCGCACTCCTTTTCGG 3'	438
cafI	Plasmid pMT1 vi khuẩn dịch hạch	F R	5' CGCTTACTCTTGGCGGCTAT 3' 5' GCTGCAAGTTTACCGCCTTT 3'	271

3. Tách chiết DNA

Vi khuẩn *B. anthracis* và *Y. pestis* được thu hoạch trong nước muối sinh lý, nồng độ vi khuẩn đạt 10^6 vk/ml. Tiến hành bất hoạt vi khuẩn bằng nhiệt ưót ở 121°C x 15 phút để đảm bảo tất cả thể dinh dưỡng và bào tử (đối với *B. anthracis*) đều bị tiêu diệt [8]. Sau đó dung dịch canh khuẩn được tiến hành tách chiết theo thường qui của bộ kit QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Đức). Toàn bộ qui trình này được thực hiện trong phòng an toàn sinh học cấp 2 và cấp 3 của Học viện Quân y.

Thiết kế và tối ưu hóa phản ứng multiplex PCR khuếch đại đồng thời 6 gen đích của *B. anthracis* và *Y. pestis*

Phản ứng multiplex PCR được thiết kế dựa trên phản ứng PCR tiêu chuẩn (tổng thể tích $25\mu\text{l}$, trong đó các thành phần cơ bản gồm: Buffer nồng độ là 1X,

dNTPs nồng độ là $200\mu\text{M}$ /mỗi loại, MgCl_2 nồng độ khoảng 1-4mM, primer nồng độ khoảng 0,04-0,6 μM /mỗi loại, Taq polymerase nồng độ khoảng 1-2U/ $25\mu\text{l}$, DNA template nồng độ là 150ng/ $25\mu\text{l}$) [4]. Tuy nhiên, trong phản ứng multiplex PCR có bổ sung thêm các cặp mồi để phát hiện đồng thời các gen khác nhau, việc bổ sung này làm cho nồng độ của các thành phần thay đổi so với phản ứng PCR tiêu chuẩn, đồng thời có thể xảy ra hiện tượng các cặp mồi ức chế, bắt cặp chéo lẫn nhau dẫn tới không phát hiện được các gen đích quan tâm. Chính vì vậy tiến hành tối ưu hóa thành phần và chu trình nhiệt của phản ứng multiplex PCR để đảm bảo phản ứng phát hiện được đồng thời các gen đích quan tâm. Các nội dung tối ưu hóa bao gồm:

Tối ưu hóa nồng độ mồi và lượng

DNA mẫu bằng cách tiến hành phản ứng PCR với nồng độ các môi và lượng DNA mẫu khác nhau của 2 vi khuẩn, sau đó căn cứ vào kết quả điện di để lựa chọn nồng độ các môi và lượng DNA thích hợp của từng loại vi khuẩn.

Tối ưu hóa nhiệt độ gắn môi bằng cách chạy gradient nhiệt độ gắn môi, nhiệt độ trung gian được chia tự động trên máy iCycler từ 54°C đến 58°C. Thời gian gắn môi áp dụng là 45 giây, số chu kỳ phản ứng áp dụng là 32.

Tối ưu hóa nồng độ $MgCl_2$ bằng cách cố định nồng độ dNTP và chọn dải nồng độ $MgCl_2$ từ 2 - 3 - 4 - 5mM. Tối ưu hóa nồng độ dNTP bằng cách cố định nồng độ $MgCl_2$ đã tối ưu và chọn dải nồng độ dNTP từ 0,25 - 0,4 - 0,8mM.

Phản ứng PCR được tiến hành trên máy GeneAmp PCR System 9700 và iCycler.

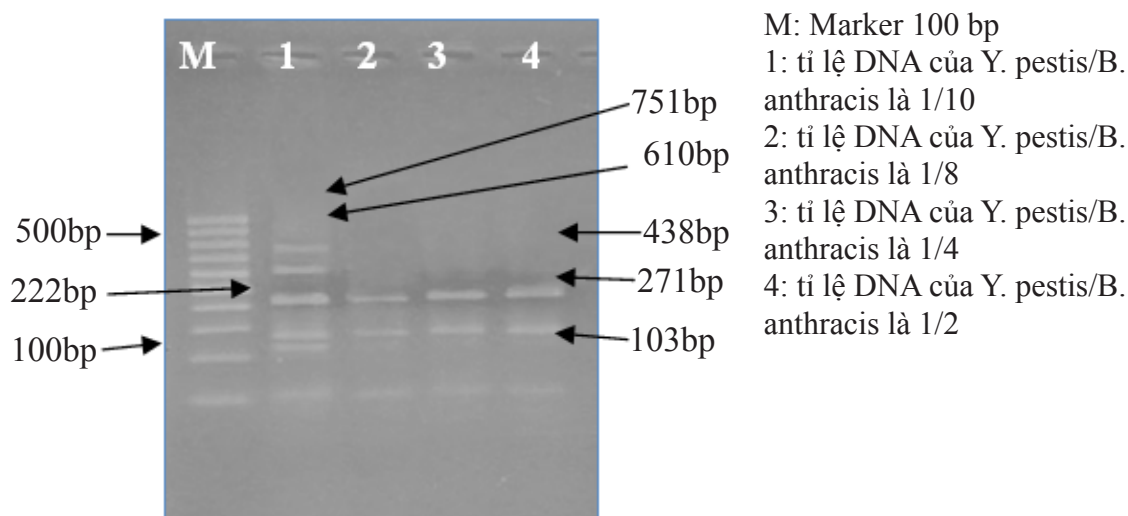
Sản phẩm PCR sẽ được điện di trên

gel Agarose 2% trong dung dịch đệm TBE 0,5X (100V/50 phút), sau đó nhuộm trong Ethidium bromide 15 phút và chụp ảnh gel.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Tối ưu hàm lượng DNA và nồng độ môi của *B. anthracis* và *Y. pestis*

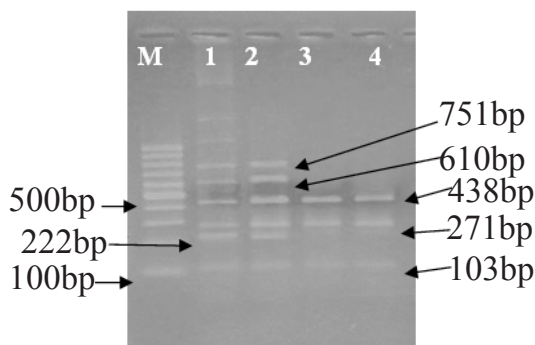
Tối ưu hàm lượng DNA và nồng độ môi cho phản ứng multiplex PCR bằng cách tiến hành lặp lại 3 lần, mỗi lần thực hiện 16 phản ứng multiplex PCR giống nhau về các thành phần chỉ khác về tỉ lệ hàm lượng DNA của *Y. pestis*/*B. anthracis* và nồng độ các cặp môi sử dụng. Trong đó tỉ lệ hàm lượng DNA của *Y. pestis*/*B. anthracis* thay đổi theo các tỉ lệ 1/2, 1/4, 1/8, 1/10, với mỗi tỉ lệ trên tiến hành 4 phản ứng với nồng độ các cặp môi sử dụng chẩn đoán *Y. pestis* và *B. anthracis* lần lượt là (0,1; 0,6 μM), (0,2; 0,5 μM), (0,3; 0,4 μM), (0,4; 0,3 μM).



Hình 1. Tối ưu lượng DNA và nồng độ môi của của *B. anthracis* và *Y. pestis* trong phản ứng multiplex PCR.

Kết quả thể hiện trên hình 1 cho thấy khi tỉ lệ hàm lượng DNA của *Y. pestis*/*B. anthracis* trong phản ứng bằng 1/10 và nồng độ của các cặp môi sử dụng chẩn

đoán *Y. pestis* là 0,1 μM ; *B. anthracis* là 0,6 μM thì sản phẩm xuất hiện cả 6 băng đặc hiệu tương ứng với 6 gen đích và không có băng phụ.



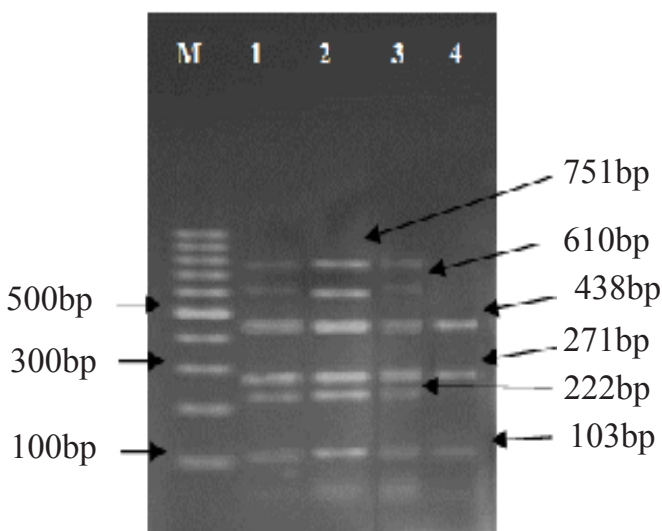
M: Marker 100 bp
 1: nhiệt độ gắn mồi là 54°C
 2: nhiệt độ gắn mồi là 56°C
 3: nhiệt độ gắn mồi là 57°C
 4: nhiệt độ gắn mồi là 58°C

Hình 2. Tối ưu nhiệt độ gắn mồi cho phản ứng multiplex PCR

Kết quả trên hình 2 cho thấy ở nhiệt độ gắn mồi là 56°C thì sản phẩm xuất hiện cả 6 băng đặc hiệu tương ứng với 6 gen đích và không có băng phụ.

2. Tối ưu nồng độ $MgCl_2$

Để tối ưu nồng độ $MgCl_2$, tiến hành lặp lại 3 lần, mỗi lần thực hiện 4 phản ứng multiplex PCR giống nhau về các thành phần, chỉ khác nhau về nồng độ $MgCl_2$ (2mM, 3mM, 4mM, 5mM).



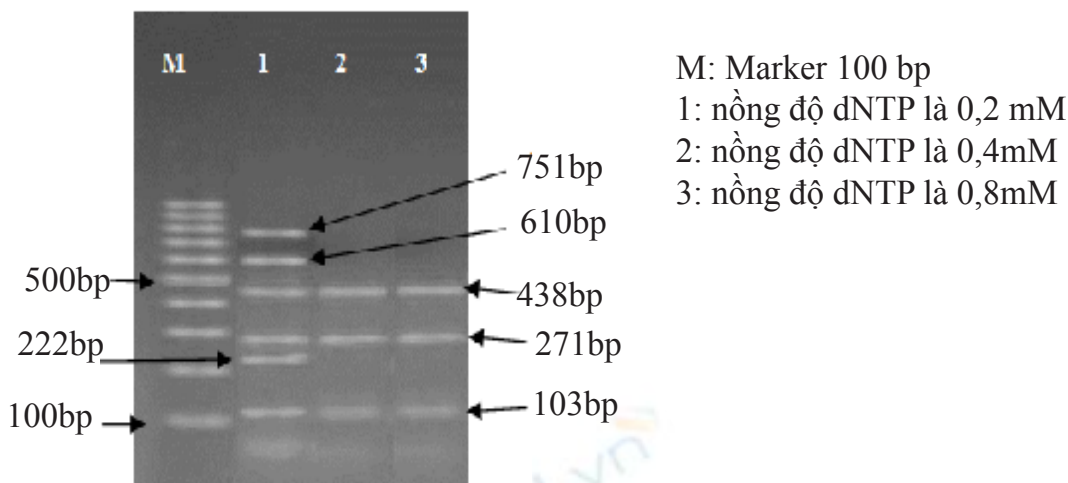
M: Marker 100 bp
 1: nồng độ $MgCl_2$ là 2mM
 2: nồng độ $MgCl_2$ là 3mM
 3: nồng độ $MgCl_2$ là 4mM
 4: nồng độ $MgCl_2$ là 5mM

Hình 3. Tối ưu nồng độ $MgCl_2$ cho phản ứng multiplex PCR

3. Tối ưu nhiệt độ gắn mồi

Để tối ưu nhiệt độ gắn mồi, tiến hành lặp lại 3 lần, mỗi lần 4 phản ứng multiplex PCR giống nhau về các thành phần, chỉ khác nhau về nhiệt độ gắn mồi (54°C, 56°C, 57°C, 58°C).

Kết quả trên hình 3 cho thấy ở nồng độ $MgCl_2$ là 3mM thì sản phẩm xuất hiện cả 6 băng đặc hiệu tương ứng với 6 gen đích và không có băng phụ.

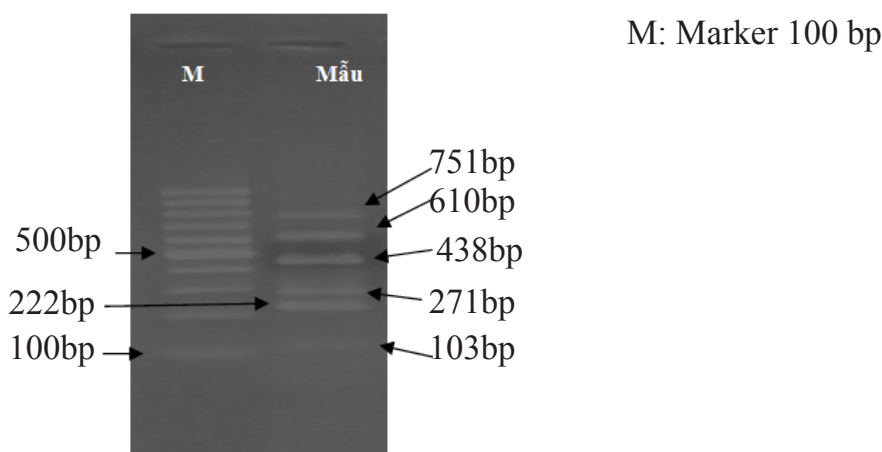


Hình 4. Tối ưu nồng độ dNTP cho phản ứng multiplex PCR

Kết quả trên hình 4 cho thấy ở nồng độ dNTP là 0,25mM thì sản phẩm xuất hiện cả 6 băng đặc hiệu tương ứng với 6 gen đích và không có băng phụ.

4. Phản ứng multiplex PCR với thành phần và chu kỳ nhiệt đã tối ưu

Tiến hành thực hiện lặp lại 3 lần phản ứng PCR với thành phần và chu kỳ nhiệt đã tối ưu, kết quả thu được như hình sau.



Hình 5. Phản ứng multiplex PCR sau khi đã tối ưu

5. Tối ưu nồng độ dNTP

Để tối ưu nồng độ dNTP, tiến hành lặp lại 3 lần, mỗi lần thực hiện 3 phản ứng multiplex PCR giống nhau về các thành phần, chỉ khác nhau về nồng độ của dNTP.

Kết quả thực hiện phản ứng multiplex PCR với thành phần và chu kỳ nhiệt đã tối ưu được thể hiện trên hình 5 cho thấy: Xuất hiện cả 6 băng đặc hiệu tương ứng

với 6 gen đích của *B. anthracis*, *Y. pestis* và không có băng phụ.

KẾT LUẬN

Thiết kế và tối ưu hóa thành công phản ứng multiplex PCR chẩn đoán đồng thời vi khuẩn than và dịch hạch sử dụng 6 cặp mồi được thiết kế để khuếch đại 6 gen đích trong đó 2 gen trên chromosome (*VrrA*, *ypo2088*) và 4 gen trên plasmid

(*capA*, *pagA*, *pla*, *cafI*). Chu trình nhiệt là: 94°C: 4 phút - (94°C: 1 phút, 56°C: 45 giây, 72°C: 50 giây) x 32 chu kỳ - 72°C: 10 phút. Các thành phần của phản ứng gồm: Dream buffer nồng độ là 1,2X, dNTP nồng độ là 0,25mM, MgCl₂ nồng độ là 3mM, Dream Taq DNA polymerase nồng độ là 2,5U, primer (*VrrA*, *pagA*, *capA*) nồng độ là 0,6μM, primer (*ypo2088*, *pla*, *cafI*) nồng độ là 0,1μM, tỉ lệ DNA template của *Y. pestis*/*B. anthracis* là 1/10.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hoàng Thị Thu Hà và Cs (2012). PCR chẩn đoán nhanh, chính xác vi khuẩn *Bacillus anthracis* trực tiếp từ bệnh phẩm lâm sàng và môi trường, Y học dự phòng, số 8, tr.155-163.

2. Nguyễn Thái Sơn và Cs (2011). Nghiên cứu một số biện pháp ứng phó tình huống bị tấn công bởi tác nhân sinh học trực khuẩn than (*Bacillus anthracis*), Báo cáo tổng kết nhiệm vụ cấp Bộ QP, dự án A037.

3. Nguyễn Thái Sơn và Cs (2011). Nghiên cứu một số biện pháp ứng phó tình huống bị tấn công bởi tác nhân sinh học vi khuẩn dịch hạch (*Yersinia pestis*), Báo cáo tổng kết nhiệm vụ cấp Bộ QP, dự án A037.

4. Henegariu O., Heerema N. A.,

Dlouhy S. R. et al. (1997), "Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol", Biotechniques, 23(3), pp. 504-11.

5. Leggiadro R. J. Bioterrorism: a clinical reality, Pediatr Ann. 2007, 36(6), pp. 352-8.

6. Matero P., Pasanen T., Laukkanen R. et al (2009). Real-time multiplex PCR assay for detection of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*, APMIS, 117(1), pp. 34-44.

7. Safari Foroshani N., Karami A., Pourali F (2013). Simultaneous and Rapid Detection of *Salmonella typhi*, *Bacillus anthracis*, and *Yersinia pestis* by Using Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR), Iran Red Crescent Med J., 15(11), pp. e9208.

8. Spotts Whitney E. A., Beatty M. E., Taylor T. H., Jr. et al. (2003) Inactivation of *Bacillus anthracis* spores, Emerg Infect Dis, 9(6), pp. 623-7.

9. Stewart A., Satterfield B., Cohen M. et al. (2008) A quadruplex real-time PCR assay for the detection of *Yersinia pestis* and its plasmid, J Med Microbiol. 57(Pt 3), pp. 324-31.