

## TÁCH DÒNG VÀ XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ GEN *STX1* VÀ *STX2* CỦA VI KHUẨN *E. COLI* O157:H7 Ở VIỆT NAM

Hoàng Phú Hiệp<sup>1</sup>, Lê Quang Huân<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên, Đại học Thái Nguyên

<sup>2</sup>Viện Công nghệ sinh học, VAST

### TÓM TẮT

Tiêu chảy, viêm ruột, hay hội chứng xung huyết và suy thận... là các triệu chứng điển hình liên quan đến bệnh do vi khuẩn *Escherichia coli* O157:H7 gây ra (*E. coli* O157:H7), vi khuẩn này thuộc nhóm *E. coli* tạo độc tố Shiga (*Shiga toxin-producing Escherichia coli*, STEC). Nhân tố trực tiếp gây bệnh là độc tố Shiga do chủng STEC tiết ra. Độc tố Shiga có hai họ là shiga toxin 1 (*stx1*) và shiga toxin 2 (*stx2*). Việc phát hiện nhanh nguồn gây bệnh cũng như phân loại chính xác các chủng vi khuẩn *E. coli* là rất quan trọng và cần thiết. Hiện nay, để phân loại *E. coli* người ta thường dựa vào gen độc tố. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tách dòng hai gen *stx1* và *stx2* của vi khuẩn *E. coli* O157:H7 thu thập được tại Hà Nội: gen *stx1* có kích thước 151 bp; đoạn gen *stx2* có kích thước 205 bp. Hai gen *stx* mà chúng tôi tách dòng đều nằm ở tiểu phần A, tiểu phần có vai trò như một enzyme N-glycosidase. Khi so sánh trình tự với các trình tự đã công bố trên ngân hàng gen Quốc tế bằng phần mềm FASTA cho thấy trình tự nucleotide của đoạn gen mà chúng tôi thu được có độ tương đồng cao (trên 99%) với trình tự gen *stx* của các chủng vi khuẩn *E. coli* O157:H7 khác. Kết quả thu được là cơ sở cho việc tạo bộ kit phát hiện nhanh *E. coli* nhóm STEC sau này.

**Từ khóa:** *E. coli* O157:H7, shiga toxin, gen *stx1*, gen *stx2*, PCR, vector pJET1.2

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Hầu hết các bệnh ở người như tiêu chảy, viêm ruột, hay hội chứng xung huyết và suy thận (*Hemolytic Uremic Syndrome*, HUS) đều liên quan đến vi khuẩn *E. coli* O157:H7, vi khuẩn này thuộc nhóm *E. coli* tạo độc tố Shiga (*Shiga toxin-producing Escherichia coli*, STEC) (Griffin, Tauxe, 1991). Nhân tố trực tiếp gây bệnh là độc tố Shiga do chủng STEC tiết ra (Mead, Griffin, 1998).

Độc tố shiga được xác định lần đầu tiên bởi Kiyoshi Shiga vào năm 1898 do vi khuẩn *Shigella dysenteriae* tiết ra. Độc tố Shiga có hai họ là Shiga toxin 1 (*stx1*) và Shiga toxin 2 (*stx2*) (Wang *et al.*, 2002). Trước đây, gen *stx1* được biết chỉ có duy nhất một biến thể (Melton-Celsa, O'Brien, 1998), gần đây một biến thể của *stx1* là *stx1c* đã được công bố (Zhang *et al.*, 2002). Trong khi gen *stx2* gồm nhiều biến thể như *stx2*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*,... (Kawano *et al.*, 2008), nhưng chỉ có biến thể *stx2c* được tìm thấy trong chủng *E. coli* O157:H7 (Fraser *et al.*, 2004). Các biến thể *stx2* được phân biệt với nhau nhờ các đặc điểm như hoạt tính sinh học, phản ứng miễn dịch, hoặc thụ thể mà nó kết hợp. Do đặc tính kết hợp với thụ thể khác nhau dẫn đến khả năng gây độc đối với từng tế bào khác nhau. Theo nghiên cứu của

Ostroff và đồng tác giả (1989), chủng vi khuẩn STEC tạo *stx2* có liên quan chặt chẽ với hội chứng HUS hơn các chủng vi khuẩn chỉ tạo ra *stx1* (Scotland *et al.*, 1987).

Độc tố Shiga thường có cấu trúc A<sub>1</sub>B<sub>5</sub>, bao gồm 1 tiểu phần A và 5 tiểu phần B (Fraser *et al.*, 2004). Tiểu phần A có vai trò như một enzyme N-glycosidase cắt một base adenine của tiểu phần 28S rRNA thuộc ribosome 60S dẫn tới quá trình tổng hợp protein trong tế bào nhiễm bệnh bị dừng lại. Sự khác nhau về gen hay acid amin của tiểu phần A giữa *stx1* và *stx2* là khoảng 55%. Năm tiểu phần B có các vị trí kết hợp với glycolipid trên bề mặt của tế bào đích, do vậy, năm tiểu phần này tương tự như cầu nối trung gian để tiểu phần A xâm nhập vào trong tế bào.

Việc phát hiện nhanh *E. coli* gây bệnh là rất quan trọng, do 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.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tách dòng hai gen *stx1* và *stx2* của vi khuẩn *E. coli* O157:H7 nhằm tạo tiền đề cho những nghiên cứu để phát triển các phương pháp phát hiện nhanh vi khuẩn *E. coli* O157:H7 sau này.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Vì khuẩn *E. coli* O157:H7, chủng này được cung cấp từ bộ môn vi sinh vật Trường Đại học Khoa Học Tự Nhiên- Đại học Quốc Gia Hà Nội.

Các hoá chất sử dụng trong thí nghiệm đều là những hoá chất tinh khiết được sử dụng trong các phòng thí nghiệm về sinh học phân tử (hoá chất của các hãng Sigma, Invitrogen, Merck...).

Các cặp mồi:

*Stx1*F: 5'-CGAATCTACATACGTCTTTGCAGTC-3'

*Stx1*R: 5'-ATCTATCCCTCTGACATCAACTGC-3';

*Stx2*F: 5'-ATTAACCACACCCACCG-3';

*Stx2*R: 5'-GTCATGGAAACCGTTGTCAC-3';

pJET sequencing F: 5'-CGACTCACTATAGGG AGAGCGGC -3';

pJET sequencing R: 5'-AAGAACATCGATTT TCCATGGCAG -3'.

### Phương pháp

Phương pháp tách DNA tổng số của vi khuẩn, DNA plasmid được tiến hành theo phương pháp của Sambrook và Rusell (2001).

Các phương pháp về sinh học phân tử như cắt, nối các đoạn gen, tách chiết plasmid, biến nạp plasmid vào tế bào *E. coli*, điện di kiểm tra sản phẩm trên gen agarose,... được tiến hành theo phương pháp của Sambrook và Rusell (2001).

Hai gen *stx1* và *stx2* được khuếch đại trên máy GenAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 với hai cặp mồi *stx1*F/*stx1*R và *stx2*F/*stx2*R và được kiểm tra với hai cặp mồi của vector pJET1.2. Thành phần phản ứng như sau: Đệm: 2,5 µl, Mg<sup>2+</sup>: 2,5 µl, dNTP: 2,5 µl, mồi F: 0,8 µl, mồi R: 0,8 µl, Taq DNA polymerase: 0,2 µl, DNA template: 5 µl, H<sub>2</sub>O: 11,2 µl. Chu trình nhiệt như sau: 94°C 60 giây; 52°C 60 giây; 72°C 1 phút 20 giây, lặp lại 30 chu kỳ từ bước 1; 72°C 10 phút.

Trình tự gen *stx1* và *stx2* được xác định trên máy giải trình tự tự động ABI 3110 với hai cặp mồi pJET sequencing F/ pJET sequencing R.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Tách chiết DNA tổng số từ tế bào vi khuẩn

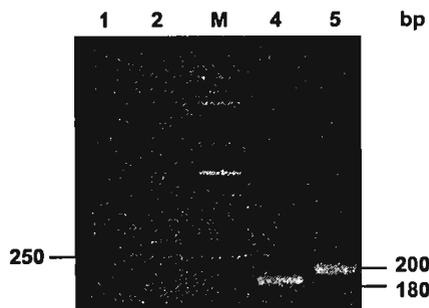
DNA tổng số của vi khuẩn *E. coli* O157:H7

được tách theo phương pháp của Sambrook và Russell (2001). Kết quả kiểm tra cho thấy, DNA tổng số được tách chiết không bị đứt gãy và không có sản phẩm phụ, có độ tinh sạch cao, đạt chất lượng sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

### Nhân bản đoạn gen *stx1* và *stx2*

Gen *stx1* và *stx2* được khuếch đại từ DNA tổng số của chủng vi khuẩn DH5α và *E. coli* O157:H7 bằng hai cặp mồi đặc hiệu *stx1*F/*stx1*R và *stx2*F/*stx2*R.

Kết quả điện di hình 1 cho thấy ở giếng số 1 và giếng số 2 không xuất hiện băng chứng tỏ vi khuẩn *E. coli* DH5α không mang gen *stx1* và *stx2*. Giếng số 3 xuất hiện một băng có kích thước khoảng 180 bp, kích thước này tương ứng với kích thước của gen *stx1* theo tính toán lý thuyết. Giếng số 2 có một băng vạch sáng đậm có kích thước khoảng 200 bp, kích thước này phù hợp với kích thước của gen *stx2* như tính toán theo lý thuyết. Như vậy, chúng tôi có thể khẳng định bước đầu đã nhân bản thành công hai gen *stx1* và *stx2*.



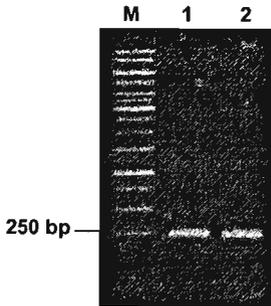
Hình 1. Sản phẩm nhân gen *stx1* và *stx2*. M: marker; 1: PCR với cặp mồi *stx1*F/*stx1*R đối với *E. coli* DH5α; 2: PCR với cặp mồi *stx2*F/*stx2*R đối với *E. coli* DH5α; 3: PCR với cặp mồi *stx1*F/*stx1*R đối với *E. coli* O157:H7; 4: PCR với cặp mồi *stx2*F/*stx2*R đối với *E. coli* O157:H7.

### Chọn dòng gen *stx1* và *stx2* trong vector pJET1.2/blunt

Để tách dòng và xác định trình tự hai gen *stx1* và *stx2* chúng tôi sử dụng vector pJET1.2/blunt. Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được gắn trực tiếp vào vector pJET1.2/blunt, sau đó sản phẩm lai được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* DH5α không có độc tố Shiga và được cấy trên môi trường thạch LB có bổ sung ampicillin. Để chọn được dòng mang plasmid tái tổ hợp mong muốn, chúng tôi tiến hành tách chiết plasmid của một số khuẩn lạc đối với từng gen và kiểm tra gen bằng phương pháp PCR với cặp

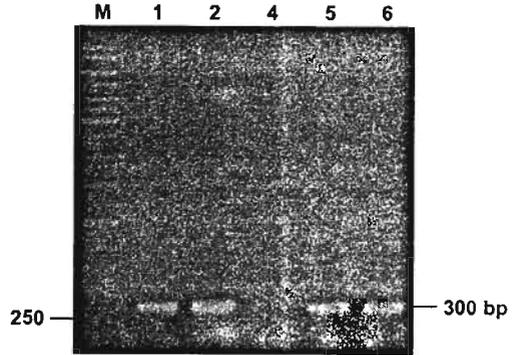
mồi trên vector pJET1.2 do hãng Fermentas cung cấp. Cặp mồi này sẽ khuếch đại đoạn trình tự nằm giữa vị trí đa tách dòng của vector.

Đối với *stx1* cả hai dòng plasmid lựa chọn đều chứa gen, sau khi điện di cả 2 mẫu đều có 1 băng kích thước khoảng 250 bp (hình 2). Đối với *stx2*, chúng tôi tiến hành chọn 5 dòng vi khuẩn và chạy PCR. Theo tính toán lý thuyết, sản phẩm PCR là một băng có kích thước khoảng 300 bp.



Hình 2. Sản phẩm PCR với cặp mồi của vector. M: Marker; 1, 2: dòng khuẩn lạc 1 và 2.

Kết quả kiểm tra trên gel agarose (hình 3) cho thấy các giếng số 1, 2, 4, 5 đều có 1 băng vạch sáng, rõ nét có kích thước khoảng 300 bp. Riêng giếng số 3 không xuất hiện băng sản phẩm PCR, như vậy, chúng tôi có thể kết luận các dòng khuẩn lạc số 1, 2, 4, 5 có mang gen *stx2*. Đến đây, để khẳng định chắc chắn kết quả tách dòng của mình chúng tôi tiến hành tinh sạch sản phẩm PCR và giải trình tự plasmid thu được của dòng số 1 đối với gen *stx1* và dòng số 5 đối với gen *stx2*.



Hình 3. Sản phẩm PCR với cặp mồi của vector. M: Marker; 1-5: dòng khuẩn lạc số 1-5.

**Đối với gen *stx1*:**

ATCTATCCCTCTGACATCAACTGCAAAACAAAT TATCCCCTGT GCCACTATCA ATCATCAGTA  
 AAGACGTACC TCCTGATGAA ATAGTCTGTA ATGGAGTACC TATTGCAGAG CGAATGACAT  
 TCAGCGAATCTACATACGTCCTTTGCAGTC

**Trình tự protein suy diễn là:**

TAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGDNLFAVDVRGID

**Đối với gen *stx2*:**

ATTAACCACACCCACCGGGC AGTTATTTTG CTGTGGATAT ACTAGGGCTT GATGTCTATC  
 AGGCGCGTTT TGACCATCTT CCTCTGATTA TTGAGCAAAA TAATTTATAT GTGGCCGGGT  
 TCGTTAATAC GGCAACAAAT ACTTTCTACC GTTTTTCAGA TTTTACACAT ATATCAGTGC  
 CCGGTGTGACCAACGGPITCCATGAC

**Trình tự protein suy diễn là:**

INHTPPGSYFAVDIRGLDVYQARFDHLRLIIEQNNLYVAGFVNTATNTFYRFSDFTHISV

Hình 4. Xác định trình tự đoạn gen *stx1* và *stx2*.

**Xác định trình tự đoạn gen *stx1* và *stx2***

Sau khi tách chiết và tinh sạch DNA plasmid, chúng tôi xác định trình tự gen theo phương pháp

của Sanger và đồng tác giả, sử dụng trên máy xác định trình tự tự động. Kết quả xác định trình tự được trình bày trên hình 4.

Sau khi xử lý số liệu, chúng tôi thu được đoạn

gen *stx1* có kích thước 151 bp (tương ứng 50 acid amin); đoạn gen *stx2* có kích thước 205 bp (tương ứng 68 acid amin). Hai gen *stx* mà chúng tôi tách dòng đều nằm ở tiểu phần A, tiểu phần có vai trò như một enzyme N-glycosidase. Kết quả so sánh trình tự với các trình tự đã công bố trên ngân hàng gen Quốc tế bằng phần mềm FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/>) cho thấy trình tự nucleotide (và trình tự acid amin) của đoạn gen *stx* có độ tương đồng cao (trên 99%) với trình tự nucleotide (và trình tự acid amin) hai gen *stx* của các chủng vi khuẩn *E. coli* O157:H7 khác.

## KẾT LUẬN

Hai gen *stx1* và *stx2* của vi khuẩn *E. coli* O157:H7 đã được tách dòng; gen *stx1* và *stx2* có kích thước tương ứng là 151 bp và 205 bp.

Gen *stx* có độ tương đồng hơn 99% so với các trình tự gen *stx* của các chủng *E. coli* O157:H7 đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Fraser ME, Fujinaga M, Cherney MM, Melton-Celsa AR, Twiddy EM, O'Brien AD, James MNG (2004) Structure of Shiga toxin type 2 (*stx2*) from *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem* 279 (25): 27511-27517.

Griffin PM, Tauxe RV (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.

Hussein HS, Omaye ST (2003) Introduction to the Food Safety Concerns of Verotoxin-Producing *Escherichia coli*. *Exp Biol Med* 228 (4): 331-332.

Kawano K, Okada M, Haga T, Maeda K, Goto Y (2008) Relationship between pathogenicity for humans and *stx* genotype in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

serotype O157. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27: 227-232.

Kehl KS, Havens P, Behnke CE, Acheson DW (1997) Evaluation of the premier Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) assay for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 35 (8): 2051-2054.

Mead PS, Griffin PM (1998) *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 352: 1207-1219.

Melton-Celsa AR, O'Brien AD (1998) Structure, biology, and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. AMS Press: 121-128.

Ostroff SM, Tarr PI, Neill MA, Lewis JH, Hargrett-Bean N, Kobayashi JM (1989) Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *J Infect Dis* 160: 994-1002.

Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL (2005) Epidemiology of *E. coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis* 11 (4): 603-609.

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Scotland SM, Willshaw GA, Smith HR, Rowe B (1987) Properties of strains of *Escherichia coli* belonging to serogroup O157 with special reference to production of Vero cytotoxins VT1 and VT2. *Epidemiol Infect* 99: 613-637.

Wang L, Huskic S, Cisterne A, Rothemund D, Reeves PR (2002) The O-antigen gene cluster of *Escherichia coli* O55:H7 and identification of a new UDP-GlcNAc C4 epimerase gene. *J Bacteriol* 184 (10): 2620-2625.

Zhang W, Bielaszewska M, Kuczius T, Karch H (2002) Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gen variant (*stx1c*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol* 40(4): 1441-1446.

## CLONING AND SEQUENCING OF *STX1* AND *STX2* OF *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 IN VIETNAM

Hoang Phu Hiep<sup>1</sup>, Le Quang Huan<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Thái Nguyên University of Education, Thai Nguyen University

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology, VAST

## SUMMARY

Severe disease and outbreaks of disease such as bloody diarrhoea, non-bloody diarrhoea and the

\* Author correspondence: Tel: 84-(0)904253600; E-mail: [huanlequang@gmail.com](mailto:huanlequang@gmail.com)

haemolytic uraemic syndrome (HUS) are most commonly due to serotype O157:H7, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *E. coli* O157:H7 often produces two antigenically distinct types of *stx*, *stx1* and *stx2* that cause of some diseases. Analysis of virulence genes is a very useful method for subtyping STEC. In this study, we used *stx* genes for typing *E. coli* O157:H7 from Hanoi, Vietnam. We obtained the *stx1* gene of 151 bp and the gene *stx2* of 205 bp in length. Comparing our collected genes with sequencing data available on the Genbank result a similarity of over 99%.

**Keywords:** *E. coli* O157:H7, PCR, shigatoxin, *stx1* gene, *stx2* gene, vector pJET1.2