

XÂY DỰNG QUY TRÌNH REAL TIME-PCR TRÊN 16S rRNA GEN CỦA VI KHUẨN LAO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

TS. Lê Huyền Ái Thúy*

ThS. Trương Kim Phượng**

Hồ Thị Thanh Thủy***

TÓM TẮT

Hiện nay, lao vẫn là một trong những bệnh nhiễm khuẩn thường gặp nhất, nguyên nhân chủ yếu là do nhiễm vi khuẩn *Mycobacterium tuberculosis*. PCR là kỹ thuật sinh học phân tử được sử dụng làm phương pháp phát hiện các tác nhân nhiễm đặc biệt là nhiễm virus hay các vi khuẩn khó nuôi cấy như trường hợp của *Mycobacterium tuberculosis* bởi phương pháp này cho kết quả nhanh, chính xác và có độ nhạy cao. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích xây dựng quy trình Realtime PCR sử dụng trình tự gen đích 16S rRNA, một trình tự được ứng dụng nhiều trong các lĩnh vực phân loại học, tiến hóa học và chẩn đoán y học. Chúng tôi đã thành công trong việc thiết kế hệ môi/mẫu dò trên 16S rRNA gen nhằm phát hiện vi khuẩn lao bằng kỹ thuật Realtime PCR, đã xác định các thông số về tính đặc hiệu của hệ môi/mẫu dò trên lý thuyết và thực nghiệm, độ nhạy của môi/mẫu dò trong quy trình Realtime PCR phát hiện DNA vi khuẩn lao đạt số lượng bản mẫu tối thiểu là 10^2 bản sao/ml và đã thử nghiệm quy trình Realtime PCR phát hiện vi khuẩn lao trên 30 mẫu bệnh phẩm ghi nhận kết quả tốt.

Từ khóa: 16S rRNA gen, *Mycobacterium tuberculosis*, Realtime PCR

ABSTRACT

Currently, tuberculosis is still one of the most common infectious diseases, mainly caused by *Mycobacterium tuberculosis* bacterium infection. PCR is a molecular biology technique used to detect infectious agents, especially viruses or bacteria with slowly culture as in the case of *Mycobacterium tuberculosis* because of its fastness, accurateness and high sensitivity.

We carried out this study in order to develop a protocol based on Realtime PCR using 16S rRNA gene as a target sequence which is extensively used in taxonomy, molecular evolution and medical diagnostics. We have succeeded in designing the primers/probes on the 16S rRNA gene to detect *Mycobacterium tuberculosis* by Realtime PCR; have identified the parameters of the specificity of the primers/probe, theoretically and experimentally; the sensitivity of the primers/probe in the Realtime PCR protocol reached to 10^2 copies/ml; the protocol was also tested on 30 samples given good results.

Key words: 16S rRNA gen, *Mycobacterium tuberculosis*, Realtime PCR

MỞ ĐẦU

Bệnh lao và vi khuẩn gây bệnh lao đã được biết rõ từ một thế kỷ nay. Những liệu pháp chữa trị bằng kháng sinh tỏ ra hiệu quả từ những năm 1960. Tuy nhiên, trong những thập niên 90 đến nay, đã xuất hiện nhiều chủng vi khuẩn lao kháng thuốc, rất khó chữa trị và đang có nguy cơ lây lan rất nhanh, đe dọa hàng triệu người trên thế giới [1, 2]. Việt Nam đứng thứ

12 trong 22 nước có số bệnh nhân lao cao trên toàn cầu. Năm 2007, Việt Nam ước tính có 150 ca nhiễm lao mới/ngày và tỷ lệ mắc bệnh là 192 ca/ngày. Tỷ lệ lao đa kháng thuốc trong tổng số ca nhiễm lao mới là 2.7%, và trong tổng số ca đã qua điều trị là 19% [2].

* PTK Khoa CNSH, Trường Đại học Mở Tp.HCM

** GVCH Khoa CNSH, Trường Đại học Mở Tp.HCM

*** Công Ty Thương mại, SX và DV Việt Á

Hiện nay, lao vẫn là một trong những bệnh nhiễm khuẩn thường gặp nhất, ảnh hưởng chủ yếu đến phổi và cũng có thể ảnh hưởng đến hệ thần kinh trung ương, hệ bạch huyết, hệ tuần hoàn, hệ niệu dục, xương và khớp.

Nguyên nhân chủ yếu là do nhiễm vi khuẩn *Mycobacterium tuberculosis*. Về bệnh lý, khoảng 90% các trường hợp nhiễm khuẩn lao là tiềm ẩn không triệu chứng. Chẩn đoán bệnh nhân lao đã được thực hiện bằng nhiều phương pháp khác nhau như chụp X quang phổi, làm phản ứng tuberculin, xét nghiệm đàm trực tiếp tìm trực khuẩn lao và PCR. Trong đó, PCR là kỹ thuật sinh học phân tử được sử dụng làm phương pháp phát hiện các tác nhân gây nhiễm đặc biệt là nhiễm virus hay các vi khuẩn khó nuôi cấy như trường hợp của *Mycobacterium tuberculosis* bởi phương pháp này cho kết quả nhanh, chính xác và có độ nhạy cao.

Từ những năm 1960, thông tin về vùng gen 16S rRNA được các nhà khoa học tìm hiểu và công bố. Hiện nay, vùng gen 16S rRNA này là một trong những vùng thông tin di truyền được sử dụng phổ biến nhằm để định danh, phân loại và xây dựng cây phát sinh loài. Các hướng nghiên cứu sử dụng vùng gen 16S rRNA này không chỉ giới hạn trong các lĩnh vực phân loại học, tiến hóa học, mà còn hướng đến các ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực chẩn đoán y học, thủy sản, môi trường [3, 4, 5, 6]. Vùng gen 16S rRNA có kích thước khoảng 1540 bp, mã hóa cho phân tử 16S rRNA, một thành phần quan trọng cấu thành nên tiểu đơn vị nhỏ của ribosome. Bên cạnh các đặc điểm kể trên, gen 16S rRNA với đặc trưng là có nhiều vùng bảo tồn ở cấp độ cho cả nhóm vi khuẩn thực (Eubacteria) và xen kẽ giữa các vùng bảo tồn đó là các vùng biến động nhưng lại mang tính bảo tồn ở cấp độ loài [3, 5]. Có thể kể ra một số các công trình hướng ứng dụng 16S rRNA gen trong chẩn đoán y học.

Radstrom *et al*, 1994, 1996, 2003, 2008; Xu *et al*, 2003; Le Huyen Ai Thuy *et al*, 2005; Marcello *et al*, 2008; Tzanakaki *et al*, 2005; Rothman *et al*, 2010; Chiba *et al*, 2009;... vvv.

Việc sử dụng vùng gen 16S rRNA trong phân loại và phả hệ học chỉ *Mycobacteria* cũng chủ yếu tập trung trên hai vùng trình tự siêu biến động A và B, tương ứng hai vùng vị trí nucleotide 130-210 và 430-500 (các vị trí này được tính theo bộ gen *E. coli*) [7, 8].

Trong thực tế, việc chẩn đoán và định danh vi khuẩn lao ở nước ta trong thời gian qua chủ yếu dựa vào các vùng *IS6110*. Đây là một trình tự chèn có kích thước khoảng dưới 2,5 kb có mặt trong hầu hết bộ gen các loài vi khuẩn lao. Việc sử dụng *IS6110* với số bản sao hiện diện trong một bộ gen là nhiều copy làm trình tự đích làm tăng độ nhạy của kỹ thuật phát hiện lên rất nhiều. Tuy nhiên, mặt hạn chế là số lượng trình tự này đôi khi thấp hơn 6 trình tự, khó “di chuyển”, và dễ mất ở một số chủng vi khuẩn lao [9]. Do đó, việc xây dựng một quy trình dựa trên một vùng trình tự khác nhằm bổ sung cho các trường hợp vùng *IS6110* bị mất đi là đòi hỏi cấp thiết trong chẩn đoán phân tử bệnh lao.

Trên thế giới, có rất nhiều công trình nghiên cứu sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử như Nested-PCR; Realtime-PCR, Multiplex realtime – PCR, PCR-Reverse dot blot...vvv, nhằm phát hiện nhanh và định danh phức hợp *Mycobacteria* gây bệnh lao ở người dựa trên trình tự 16S rRNA gen làm trình tự đích [6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15]. Nhóm nghiên cứu chúng tôi ưu tiên lựa chọn kỹ thuật Realtime PCR nhằm khai thác các ưu điểm của kỹ thuật này, cụ thể là hạn chế ngoại nhiễm (do không phải phân tích kết quả bằng điện di), độ nhạy & độ đặc hiệu của Realtime PCR cũng dễ dàng kiểm soát.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)

Mẫu bệnh phẩm

Mẫu bệnh phẩm đàm, dịch phết cổ họng nghi nhiễm vi khuẩn lao do công ty thương mại, dịch vụ và sản xuất Việt Á cung cấp. Chọn lọc 30 mẫu bệnh phẩm đã được xác định nhiễm khuẩn lao MTB được sử dụng cho thử nghiệm quy trình vừa được xây dựng trong nghiên cứu này.

Tách chiết DNA

DNA từ mẫu đàm bệnh nhân sau khi được xử lý bằng phosphate buffer và mucolytic solution kết hợp với N-Acetyl-L-Cystein, sẽ được ly trích bằng phương pháp sử dụng phenol/chloroform, phòng theo phương pháp của Chomezynski & Sacchi (1987): 100 µl huyết thanh được thêm vào 900 µl Trizol, pH8. DNA sau đó được rửa bằng Isopropanol với chất trợ rửa GlycoBlue. DNA được giữ trong dung dịch TE 1X (Tris-EDTA) và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

Thiết kế môi & mẫu dò

Các trình tự của gen 16S rRNA được thu thập từ ngân hàng gen NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Việc thiết kế môi, mẫu dò đòi hỏi tuân thủ các nguyên tắc cơ bản để đảm bảo tính đặc hiệu và tối ưu cho phản ứng Real time PCR. Các phần mềm sử dụng bao gồm Clustal X 1.81 (EMBL, Châu Âu), Annhyb - 4.922, năm 2004 (Olivier Friard, Hoa kỳ). Phần mềm trực tuyến BLAST (NCBI, Hoa Kỳ) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, Phần mềm Oligo Analyzer 3.0 (IDT, Hoa kỳ) <http://scitools.idtdna.com/scitools/Applications/OligoAnalyzer/>. Môi và mẫu dò sử dụng trong nghiên cứu này được tóm tắt trong bảng 1, trong đó S97 là môi xuôi, TBr là môi ngược và TBprobe là mẫu dò với chất phát huỳnh quang FAM và chất dập tắt huỳnh quang TAMRA.

Bảng 1. Các hệ môi và mẫu dò sử dụng trong nghiên cứu

Tên môi/ mẫu dò	Trình tự 5' - 3'	Vị trí
S97	GTGGC GAACGGGTGAGTAAC	97 - 116
TBr	CCTACCAAGGCGACGACG	266 - 283
TBprobe	FAM-CTTTCCACCACTAAGACATG-CATCCCGTGGTCC-TAMRA	210 - 178

Realtime PCR

Phản ứng được thực hiện trên máy Mxpro-Mx3005P (Stratagene) với chương trình nhiệt bao gồm 95°C- 5' (1 chu kỳ) và 40 chu kỳ lặp lại với 95°C- 15'', 60°C- 1'. Thể tích hỗn hợp phản ứng là 50 µl bao gồm: 1×dung dịch đệm PCR, 100 nmol/L môi và mẫu dò, 400 µmol/L mỗi loại dATP, dGTP, dCTP và dTTP, 1.5 units hot-start Taq DNA polymerase, 3 mmol/L MgCl₂. Mỗi đợt biến được thực hiện trong mỗi phản ứng riêng biệt.

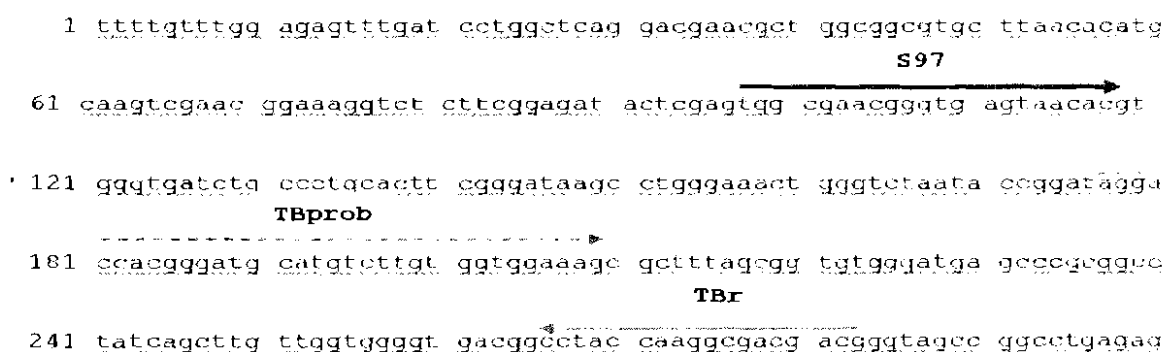
Giải trình tự

Một số sản phẩm PCR được gửi đến công ty Macrogen, Hàn quốc để tinh sạch và giải trình tự.

KẾT QUẢ & THẢO LUẬN**Tính đặc hiệu của hệ môi/mẫu dò trên lý thuyết**

Hệ môi và mẫu dò được thiết kế cho phép nhận bản đoạn trình tự mục tiêu dài 150bp trên gen 16S rRNA của các chủng trong phức hợp vi khuẩn *Mycobacteria* gây bệnh lao ở người.

Hình 1: Vị trí bắt cặp của môi và mẫu dò trên trình tự gen 16S rRNA của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*

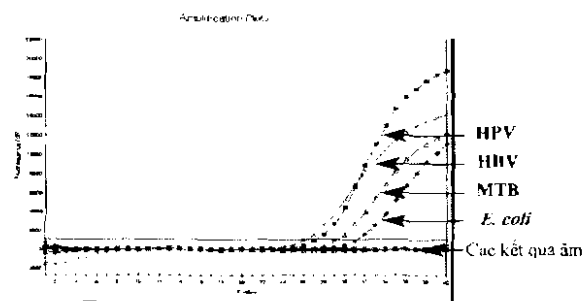


Đồng thời chúng tôi đã thực hiện khảo sát các đặc tính khác của môi và mẫu dò như cấu trúc kẹp tóc, nhiệt độ nóng chảy, thành phần % GC..., vvv). Kết quả (dữ liệu không trình bày) đều cho thấy hệ môi/mẫu dò vừa thiết kế đảm bảo tốt các thông số vừa nêu.

Tính đặc hiệu của hệ môi/mẫu dò trên thực nghiệm

Thử nghiệm độ đặc hiệu của hệ môi/mẫu dò 16S rRNA gen của vi khuẩn lao được thiết kế bằng các phản ứng Realtime PCR dựa trên các nguồn DNA *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), Human papillomavirus (HPV), Hepatitis B virus (HBV) và *Escherichia coli* (*E. coli*). Đồng thời chúng tôi cũng bố trí các phản ứng kiểm nghiệm tính đặc hiệu của từng nguồn DNA nói trên với các hệ môi/mẫu dò đặc hiệu tương ứng cho từng nguồn DNA. Mẫu chứng âm được thiết kế với các thành phần tương tự cho phản ứng Realtime PCR chỉ thay DNA bản mẫu bằng nước.

Hình 2: Kết quả khảo sát độ đặc hiệu của hệ môi/mẫu dò

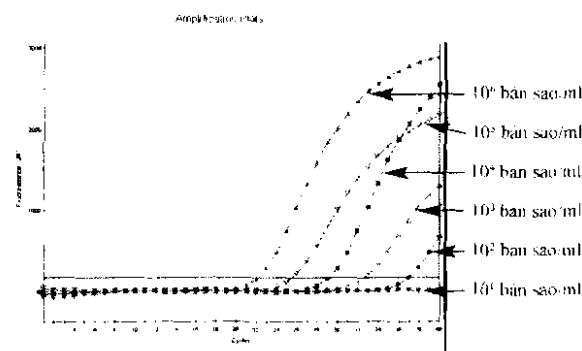


Kết quả trên cho thấy các mẫu DNA HPV, HBV và *E. coli* cho kết quả dương tính với từng cặp môi chuyên biệt dùng để phát hiện chúng (tín hiệu huỳnh quang vượt trên tín hiệu nền). Với cặp môi phát hiện MTB sử dụng trên các nguồn DNA bản mẫu khác đều cho kết quả âm tính (tín hiệu huỳnh quang thấp hơn tín hiệu nền), chỉ dương tính khi hệ môi/mẫu dò phát hiện MTB sử dụng trên DNA của MTB. Kết quả này khẳng định hệ môi/mẫu dò của 16S rRNA gen chỉ khuếch đại đặc hiệu cho DNA MTB.

Độ nhạy của hệ môi/mẫu dò

Thử nghiệm độ nhạy của hệ môi/mẫu dò 16S rRNA gen của vi khuẩn lao được thiết kế bằng các phản ứng Realtime PCR dựa trên nguồn DNA MTB được pha loãng với các nồng độ từ 10^1 – 10^6 bản sao/ml.

Hình 3: Kết quả khảo sát độ nhạy của hệ môi/mẫu dò



Kết quả trên cho thấy các nồng độ từ 10^1 – 10^6 bản sao/ml đều cho tín hiệu huỳnh quang cao hơn tín hiệu nền, cùng với các giá trị Ct phù hợp theo nguyên tắc hai nồng độ pha loãng chênh lệch nhau 10 lần thì có độ lệch Ct khoảng gần 3,3 chu kỳ; ở nồng độ DNA MTB 10^1 bản sao/ml không có tín hiệu; ở nồng độ DNA MTB 10^2 bản sao/ml, giá trị Ct là 37.94; tương ứng lần lượt các giá trị Ct ở các nồng độ DNA MTB 10^3 , 10^4 , 10^5 và 10^6 bản sao/ml là 33.60; 29.98; 26.48 và 22.96. Do đó, chúng tôi có thể kết luận độ nhạy của hệ môi/mẫu dò là rất tốt và quy trình Realtime PCR trên hệ môi/mẫu dò này có thể phát hiện DNA MTB ở nồng độ 10^2 bản sao/ml.

Thử nghiệm quy trình trên mẫu bệnh phẩm

Chúng tôi tiến hành thử nghiệm quy trình trên DNA được tách chiết từ 30 mẫu bệnh phẩm nhiễm lao nhận từ công ty Việt Á. Kết quả cho thấy với 30 mẫu thử đều cho kết quả dương tính khi thực hiện phản ứng Realtime PCR. Trong đó mẫu bệnh phẩm số 10 cho kết quả dương tính với việc phát hiện lượng DNA MTB thấp nhất là $1.08E+03 = 10.8 \times 10^3$ bản sao/ml (Bảng 2). Kết quả này cũng hoàn toàn phù hợp với kết quả thử độ nhạy của quy trình Realtime PCR ở trên.

**Bảng 2: Kết quả thử nghiệm quy trình
Realtime PCR trên 30 mẫu bệnh phẩm**

Kí hiệu mẫu	Kết quả Realtime PCR	Kí hiệu mẫu	Kết quả Realtime PCR	Kí hiệu mẫu	Kết quả Realtime PCR
1	$1.30E+06 = 1.3 \times 10^6$	11	$3.84E+03 = 3.84 \times 10^3$	21	$2.68E+03 = 2.68 \times 10^3$
2	$1.30E+08 = 1.3 \times 10^8$	12	$3.50E+08 = 3.5 \times 10^8$	22	$9.78E+03 = 9.78 \times 10^3$
3	$1.79E+09 = 1.79 \times 10^9$	13	$1.56E+09 = 1.56 \times 10^9$	23	$6.23E+04 = 6.23 \times 10^4$
4	$7.15E+08 = 7.15 \times 10^8$	14	$1.51E+09 = 1.51 \times 10^9$	24	$3.29E+06 = 3.29 \times 10^6$
5	$2.69E+05 = 2.69 \times 10^5$	15	$9.95E+08 = 9.95 \times 10^8$	25	$3.29E+04 = 3.29 \times 10^4$
6	$1.63E+07 = 1.63 \times 10^7$	16	$2.34E+09 = 2.34 \times 10^9$	26	$1.78E+07 = 1.78 \times 10^7$
7	$6.34E+08 = 6.34 \times 10^8$	17	$5.53E+09 = 5.53 \times 10^9$	27	$1.52E+07 = 1.52 \times 10^7$
8	$2.34E+04 = 2.34 \times 10^4$	18	$1.14E+09 = 1.14 \times 10^9$	28	$9.70E+06 = 9.7 \times 10^6$
9	$2.34E+09 = 2.34 \times 10^9$	19	$1.13E+04 = 1.13 \times 10^4$	29	$4.00E+05 = 4 \times 10^5$
10	$1.08E+03 = 1.08 \times 10^3$	20	$4.77E+03 = 4.77 \times 10^3$	30	$4.00E+08 = 4 \times 10^8$

Bước đầu, một số kết quả Realtime PCR này đã được kiểm chứng lại bằng giải trình tự sản phẩm PCR và kết quả của cả hai phương pháp cho thấy hoàn toàn trùng khớp.

KẾT LUẬN

Bệnh lao đã và đang tiếp tục gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe con người, là một bệnh mang tính xã hội chủ yếu ở các nước nghèo và đang phát triển. Việc chẩn đoán và phát hiện sớm bệnh lao có ý nghĩa cực kỳ quan trọng trong việc phòng chống, điều trị căn bệnh lây truyền này. Với sự hỗ trợ kinh phí phía nhà trường và của Công ty Việt Á, nhóm nghiên cứu chúng tôi trong điều kiện cho phép đã thực hiện nghiên cứu này và thu được những kết quả như sau: (1) Đã thiết kế thành công hệ môi/mẫu dò trên 16S rRNA gen nhằm phát hiện vi khuẩn lao bằng kỹ thuật Realtime PCR, (2) Đã xác định các thông số về tính đặc hiệu của hệ môi/mẫu dò trên lý thuyết và thực nghiệm, độ nhạy của môi/mẫu dò trong quy trình Realtime PCR phát hiện DNA vi khuẩn lao đạt số lượng bản mẫu tối thiểu là 10^2 bản sao/ml; (3) Đã thử nghiệm quy trình Realtime PCR phát hiện vi khuẩn lao trên 30 mẫu bệnh phẩm và ghi nhận kết quả tốt, mẫu bệnh phẩm với lượng DNA bản mẫu thấp nhất phát hiện được có nồng độ DNA là 10.8×10^2 bản sao/ml. Quy trình vừa hình thành nên

được tiếp tục thử nghiệm trên số lượng mẫu bệnh phẩm lớn hơn và so sánh với các quy trình khác đã chuẩn hóa để đánh giá toàn diện và áp dụng quy trình vào thực tế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1.WHO/HTM/TB/2008.394. (2008), *Anti-tuberculosis drug resistance in the world, 4th report: the WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance*, Geneva, World Health Organization.
- 2.WHO/HTM/TB/2009.411. (2009) *Global tuberculosis control: Surveillance, Planning, Financing*, WHO report 2009, Geneva, World Health Organization.
3. Le Huyen Ai Thuy, Duong Truong Giang, Thai Ke Quan, Ho Huynh Thuy Duong. (2005), *Ribosomal RNA genes and application in rapid diagnosis of bacterial infectious diseases*, Proceeding of 8th A-IMBN (Asia-Pacific International molecular biology network).
- 4.Gregory M.C, Michael B, Susanne G, et al. (2009) *Physiology of Mycobacteri*, *Advances in microbial physiology*, 55: 82 -182.
5. Jill E. Clarridge III. (2004), *Impact of 16SrRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4):840-862.

6. Soumitesh C, Danica H, Michele B, *et al.* (2007), *A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria*, J Microbiol Methods, 69(2): 330–339.
7. Böttger, E. C. (1996), *Approaches for identification of microorganisms. Despite longer experience with fatty acid profiles, DNA-based analysis offers several advantages*, ASM News, 62: 247–250.
8. Enrico Tortoli. (2003), *Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy: the New Mycobacteria of the 1990s*, Clinical Microbiology Reviews, 319–354.
9. Barun M, Natalia E. K, Pablo J. B, Barry N. K. (2006), *Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights*, Clinical Microbiology Reviews, 19(4): 658–685.
10. Blanca I. R, Diana I. G, Gregory L. S, *et al.* (2006), *Selective enrichment and detection of mycobacterial DNA in paucibacillary specimens*, J Microbiol Methods, 67(2): 220–229.
11. Cloud, J. L., Neal H, Rosenberry R, *et al.* (2002), *Identification of Mycobacterium spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries*, J. Clin. Microbiol, 40:400–406.
12. Richardson E.T, Samson D, Banaei N. (2009), *Rapid Identification of Mycobacterium tuberculosis and Nontuberculous Mycobacteria by Multiplex, Real-Time PCR*, Journal of Clinical Microbiology, 47(5): 1497–1502.
13. Patel, J. B, Leonard D. G, Pan, X *et al.* (2000), *Sequence-based identification of Mycobacterium species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system*, J. Clin. Microbiol, 38: 246–251.
14. Richard C. H, Luiz C. O, Ray B. W *et al.* (2003), *PCR-Based Method To Differentiate the Subspecies of the Mycobacterium tuberculosis Complex on the Basis of Genomic Deletions*, Journal of Clinical Microbiology, 41(4): 1637–1650.
15. Soo, P. C, Horng Y. T, Hsueh P. R, *et al.* (2006), *Direct and simultaneous identification of Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC) and Mycobacterium tuberculosis (MTB) by rapid multiplex nested PCR-ICT assay*, J. Microbiol. Methods, 66: 440–448.