

THIẾT KẾ VECTO MANG GIEN ĐỘC TỐ CỦA *SALMONELLA TYPHIMURIUM* LT2 BIỂU HIỆN TRONG TẾ BÀO *E. COLI*

NGUYỄN THỊ LÂM ĐOÀN

1. MỞ ĐẦU

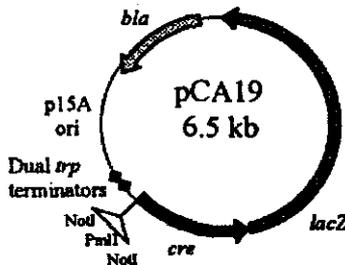
Salmonella typhimurium LT2 là một trong những vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm hay gặp nhất, có mặt trong rất nhiều nhóm thực phẩm bao gồm thịt, trứng, gia cầm, hoa quả khô [11]. Vi khuẩn này tiết ra cả nội độc tố và ngoại độc tố. Các độc tố này vào máu, phá hoại máu và gây ra ngộ độc, làm nôn mửa, tăng thân nhiệt (sốt), nhiễm khuẩn huyết, có thể làm chết người [10]. Nhiều gen tạo ra các độc tố được tìm thấy ở trên nhiễm sắc thể và trên plasmid của *S. typhimurium* LT2 [6]. Do những thực phẩm nhiễm *S. typhimurium* LT2 không bị thay đổi các tính chất cảm quan: mùi vị, hình thức bên ngoài [10]. Chính vì vậy để phát hiện vi khuẩn này là rất khó. Để giải quyết khó khăn trên hướng sử dụng công nghệ *in vivo* expression và reporter gen (gen báo cáo) để xác định gen độc tính của *S. typhimurium* LT2 đã được sử dụng [7]. Công nghệ *in vivo* expression được tiến hành bằng cách ghép một đoạn nhiễm sắc thể ngẫu nhiên của vi khuẩn *S. typhimurium* LT2 vào phía trước reporter gene của plasmid (vector) chưa có promoter [1 - 3]. Tiếp đó thông qua các reporter gen này tức là những gen mã hóa cho một loại protein dễ phân tích và dễ nhận biết [4] để từ đó ta có thể phát hiện sự có mặt gen độc tính *S. typhimurium* LT2 trong tế bào chủ [5]. Bài báo này trình bày kết quả của việc sử dụng công nghệ *in vivo* expression để thiết kế vector mang gen độc tính của *S. typhimurium* LT2 và dựa vào reporter gen *lacZ* để xác định sự có mặt của vector mang gen độc tính của *S. typhimurium* LT2 trong tế bào chủ.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng vi sinh vật: chủng *S. typhimurium* LT2 được dùng để nghiên cứu vì chủng này hay gặp ở trong thực phẩm, chủng được phòng thí nghiệm Food Microbiology KU.Leuven cung cấp.

Chủng *E. coli* MG1655 nhận được từ phòng thí nghiệm Molecular Biology California. Chủng này có đặc điểm là không có gen *LacZ*. Chủng *E. coli* DH5 α có plasmid pCA19 được phòng thí nghiệm Food Microbiology KU.Leuven cung cấp.



Hình 1. Bản đồ của plasmid pCA19

Plasmid:

Plasmid pCA19 (hình 1) được tách chiết và tinh sạch từ chủng vi khuẩn *E.coli* DH5 α . Plasmid này có kích thước là 6.5 kilo base (Kb). Trong bản đồ gen của plasmid pCA19 có gen *cre* mã hóa cho enzym *cre* ricombinase, gen *lacZ* mã hóa cho enzym β – galactosidase, gen *bla* gen mã hóa cho β – lactamase. Các gen này không có promoter. Phía trước của gen *cre* có một vị trí cắt của enzym *PmlI* cho phép gắn một đoạn ADN để tạo ra promoter của gen *cre*, *lacZ*, *bla*,

Enzim *PmlI* dùng để cắt plasmid pCA19 và cắt ADN genom của *S. typhimurium* LT2, T4 ADN ligase dùng để nối đoạn gen độc tính của *S. typhimurium* LT2 vào vectơ. Hai enzym này được nhận từ phòng thí nghiệm Molecular Biology California.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Công nghệ *in vivo* expression là một công cụ để xác định các gen độc hại của vi khuẩn. Công nghệ này được tiến hành theo phương pháp của Angelichio bằng cách ghép một đoạn nhiễm sắc thể ngẫu nhiên của vi khuẩn *S. typhimurium* LT2 vào phía trước reporter gene của plasmid (vectơ) chưa có promoter [2].

Tách chiết và tinh sạch ADN plasmid pCA19 từ vi khuẩn *E. coli* DH5 α theo hướng dẫn của nhà sản xuất (kit high pure plasmid isolation của Roche applied science) tại phòng thí nghiệm Food Microbiology KU.Leuven.

Quá trình cắt ADN plasmid pCA19 và genom của *S. typhimurium* LT2 được tiến hành bởi Enzim *PmlI* ở 37°C trong 3 giờ theo Wolf [12].

Tách chiết và tinh sạch genom ADN của *S. typhimurium* LT2 theo phương pháp của Newman [9].

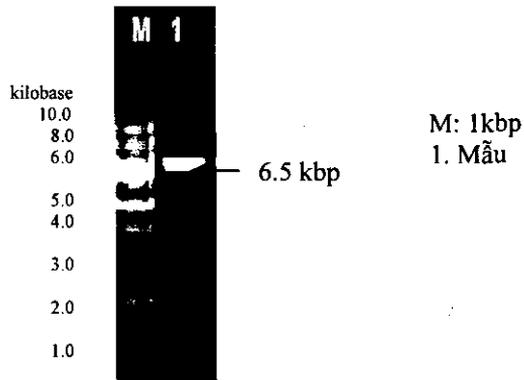
Gắn các đoạn ADN genom của *S. typhimurium* LT2 vào plasmid pCA19 nhờ enzym T4 ADN ligase theo hướng dẫn của nhà sản xuất (của hãng Molecular biology kits. Protocol - BS243 and BS244) có tại phòng thí nghiệm Food Microbiology KU.Leuven

Plasmid được biến nạp vào tế bào chủ bằng phương pháp xung điện của Wolf [13].

Nuôi cấy tế bào vi khuẩn trên môi trường LB có bổ sung thêm X-Gal (với nồng độ 0,2%) để đánh giá sự biểu hiện của vectơ trong tế bào chủ.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách chiết ADN plasmid



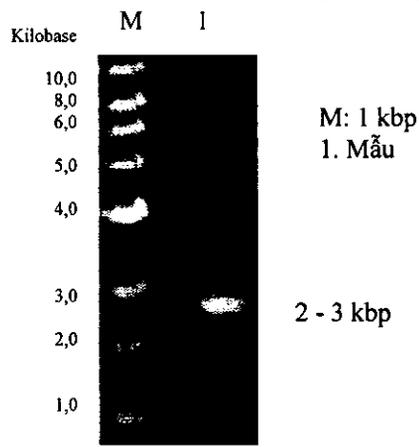
Hình 2. Sản phẩm cắt ADN plasmid pCA19 bởi Enzim *PmlI*

Plasmid này sau khi cắt sẽ được dùng làm vectơ để gắn các đoạn ADN tạo ra nhờ cắt ADN của vi khuẩn *S. typhimurium* LT2. Vị trí gắn là trước gen *cre* (gen *cre* không có promoter) ở vùng này có chứa vị trí cắt do enzym *PmlI* cho phép dễ dàng tiếp nhận một đoạn ADN nào đó cũng được cắt bởi *PmlI*.

3.2. Cắt ADN genom của *Salmonella typhimurium* LT2

ADN genom của *S. typhimurium* LT2 được tách chiết và cắt bởi enzym giới hạn *PmlI*. Kết quả điện di sản phẩm cắt được trình bày ở hình 3, cho thấy hỗn hợp cắt bao gồm rất nhiều đoạn chồng chéo lên nhau.

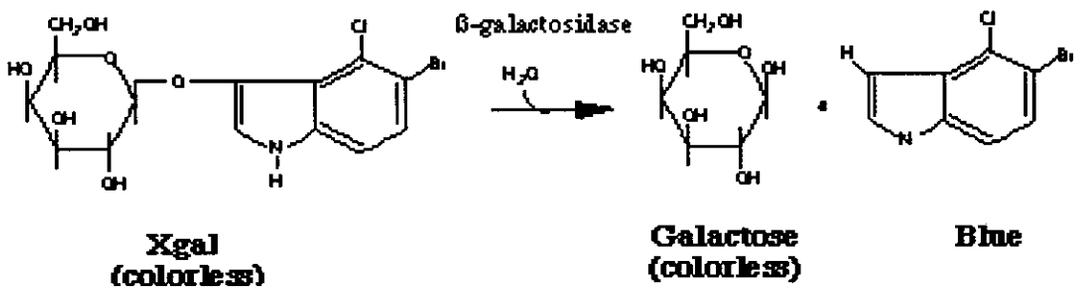
Nhưng các đoạn nằm trong vùng 2 -3 kilo base được chọn để cắt khỏi gel và tiến hành tinh sạch (vì đoạn gen đóng vai trò là promoter thường không nên quá dài) [2].



Hình 3. Sản phẩm cắt ADN genom của *S. typhimurium* LT2 bởi enzym *PmlI*

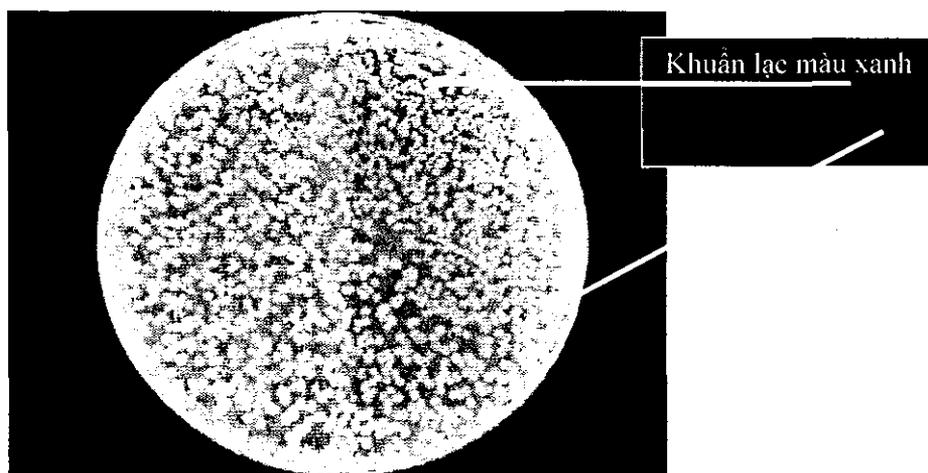
3.3. Sự biểu hiện của các vectơ mang gen độc tính của *S. typhimurium* LT2 trong tế bào chủ *E. coli* MG1655

Sau khi gắn các đoạn ADN genom của *S. typhimurium* LT2 vào plasmid pCA19 bởi Enzim T4 ADN ligase thì các vectơ mang gen độc tính này được chuyển vào trong tế bào chủ *E. coli* MG1655 để nghiên cứu sự biểu hiện của chúng. Tế bào *E. coli* MG1655 không có gen *lacZ* (*lacZ*). Gen *lacZ* mã hóa để tổng hợp enzym β - galactosidase. Enzym β - galactosidase chuyển X - gal thành hợp chất có màu xanh (hình 4).



Hình 4. β - galactosidase chuyển X - gal thành hợp chất có màu xanh

Do vậy để nhận biết đoạn gen của *S. typhimurium* LT2 đã được gắn vào plasmid pCA19 chưa và vector này có được biểu hiện trong tế bào chủ *E. coli* MG1655 hay không thì tế bào *E. coli* MG1655 đã biến nạp plasmid pCA19 được nuôi cấy trong môi trường LB + Agar + X-gal. Kết quả cho thấy có rất nhiều các khuẩn lạc được tạo thành nhưng chỉ có một số khuẩn lạc có màu xanh (hình 5). Việc hình thành những khuẩn lạc màu xanh không những có sự ghép đoạn ADN *S. typhimurium* LT2 vào plasmid pCA19 (vì plasmid pCA19 bình thường không mang promoter cho gen *lacZ*) mà còn chứng tỏ vector mang gen độc tính của *S. typhimurium* LT2 được biểu hiện ở trong tế bào chủ *E. coli* MG1655. Do ghép thành công gen *S. typhimurium* LT2 vào plasmid pCA19 đã tạo ra được promoter của gen *lacZ* nhờ vậy mà gen *lacZ* hoạt động và tạo ra được enzym β – galactosidase. Kết quả hoạt động của enzym này trên môi trường X – gal tạo thành hợp chất có màu xanh. Khi các vector này được biểu hiện trong tế bào chủ *E. coli* MG1655 làm cho xuất hiện những khuẩn lạc màu xanh (hình 5). Những khuẩn lạc màu trắng còn lại chứng tỏ vector mang gen độc tính của *S. typhimurium* LT2 không được biểu hiện.



Hình 5. Sự biểu hiện của các vector mang gen độc tố của *S. typhimurium* LT2 trong tế bào chủ *E. coli* MG1655 (những khuẩn lạc màu xanh)

4. KẾT LUẬN

Bằng công nghệ *in vivo* expression đã thiết lập được plasmid pCA19 mang gen độc tính của *S. typhimurium* LT2. Kết quả cho thấy có thể sử dụng vector này để nghiên cứu sự biểu hiện của các gen độc tính của vi khuẩn trong tế bào chủ *E. coli*.

Sự hoạt động của reporter gen (gen báo cáo) gen *lacZ* cho phép xác định sự biểu hiện của vector mang gen độc tính của *S. typhimurium* LT2 trong tế bào chủ *E. coli* MG1655 thông qua sự xuất hiện một số khuẩn lạc màu xanh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. C. Altier, M. Suyemoto - A recombinase-based selection of differentially expressed bacterial genes, *Gene*. **240** (1999) 99-106.

2. M. J. Angelichio, A. Camilli - *In Vivo* Expression technology. *Infection immunity* **70** (2002) 6518-6523.
3. C. Bell - Approach to the control of entero-haemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), *International Journal of food Microbiology* **78** (2002) 197-216.
4. I. Hautefort, J.C.D, Hinton - Measurement of bacterial gene expression *in vivo*, *Biological Sciences* **355** (2000) 601-611.
5. A. M. Lowe, D. T. Beattie, R. L. Deresiewicz - Identification of novel staphylococcal virulence genes by *in vivo* expression technology, *Molecular Microbiol* **27** (1998) 967-976.
6. S. L. Marcus, J. H. Brumell, C. G. Pfeifer AND B. B. Finlay - *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbial AND infection* **2** (2000) 145-156.
7. M. J. Mahan, J.M. Slauch, J. J. Mekalanos - Selection of bacteria virulence genes that are specifically induced in host tissues, *Science* **259** (1993) 686-688.
8. J. J. Mekalanos - Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria, *Journal Bacteriology* **174** (1992) 1-7.
9. J. D. Newman. Isolation of genomic DNA from bacteria, 1998, (<http://srv2.lycoming.edu/~newman/rna/gdnaisol.htm>).
10. Lương Đức Phẩm - Vi sinh vật học và an toàn vệ sinh thực phẩm, Nhà xuất bản Nông nghiệp, 2000, tr. 162-163.
11. Trần Linh Thuộc - Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm, Nhà xuất bản Giáo dục, 2002, tr. 6.
12. J. B. Wolf - Restriction Enzim digestion of DNA, Department of Biological Science, 1000 Hilltop Circle Baltimore, 2006. (<http://userpages.umbc.edu/~jwolf/m3.htm>).
13. J. B. Wolf - Transformation of *E. coli* by Electroporation, Department of Biological Science, 1000 Hilltop Circle Baltimore, 2006 (<http://userpages.umbc.edu/~jwolf/m7.htm>).

SUMMARY

CONSTRUCTION VECTOR CONTAINING *SALMONELLA TYPHIMURIUM* LT2'S TOXIC GENE DNA EXPRESSION IN *E. COLI*

In vivo expression technology was used to determine *Salmonella typhimurium* LT2 virulence gene. The result obtained that plasmid pCA19 which contained toxic *S. typhimurium* LT2 gene was designed successfully. The expression of plasmid pCA19 in *E. coli* MG1655 was carried out by reporter gene system. A reporter gene is a gene that encodes an assayable protein whose expression is easily detectable. In this study lacZ reporter gene was used to encode for enzyme β - galactosidase. This enzyme converts colorless substrate X - gal into galactose (colorless) and blue product. The result showed that some blue colonies appeared on containing medium X-gal substrate. It indicated that they contained toxic *S. typhimurium* LT2 gene vector expressed in *E. coli* MG1655.

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 15 tháng 2 năm 2008

Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.