

PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN TRÊN GENE *PBP2X* Ở MỘT SỐ CHỦNG *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* KHÁNG PENICILLIN BẰNG QUY TRÌNH PCR-SSCP

Tạ Văn Quang, Phan Minh Duy, Đông Sỹ Huy,
Nguyễn Hoàng Chương, Hồ Huỳnh Thùy Dương
Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên – ĐHQG-HCM
(Bài nhận ngày 17 tháng 7 năm 2003)

TÓM TẮT: Quy trình PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) được sử dụng để phát hiện sự hiện diện các đột biến điểm trên một trình tự gene *pbp2x* từ 20 chủng *Streptococcus pneumoniae* kháng penicillin. Kết quả cho thấy tất cả các chủng khảo sát đều có mang trên hai đột biến điểm khi so sánh với chủng nhạy.

TỔNG QUAN

Hiện tượng kháng kháng sinh ở nhiều vi khuẩn gây bệnh đang là vấn đề đáng báo động không chỉ ở Việt Nam. Kháng sinh họ β -lactam như penicillin vốn là vũ khí hữu hiệu chống nhiễm khuẩn ngày càng mất tác dụng do sự kháng thuốc ở vi khuẩn. Do đó, việc hiểu rõ tính kháng penicillin ở *Streptococcus pneumoniae*, khu trú trong đường hô hấp của người và gây nhiều bệnh nguy hiểm như viêm phổi cấp tính, viêm xoang, viêm phế quản, viêm màng não, ... có ý nghĩa quan trọng cho điều trị.

“Đích” liên kết của kháng sinh họ β -lactam ở tế bào vi khuẩn là các enzyme xúc tác sự tổng hợp lớp peptidoglycan của vách tế bào, các PBP (Penicillin Binding Protein). Sự liên kết giữa penicillin và PBP sẽ gây chết vi khuẩn do ức chế quá trình tổng hợp vách tế bào [1]. Ở *Streptococcus pneumoniae* có nhiều loại PBP mã hoá bởi các gene *pbp* tương ứng. Những đột biến xuất hiện trên các gene mã hóa cho PBP1A, 2A, 2B và 2X có thể dẫn đến sự thay đổi cấu trúc các protein này [2]. Khi đó, ái lực của chúng với penicillin sẽ giảm dẫn đến sự kháng kháng sinh này. Theo Yasuko Asahi và cộng sự (1999)[3], những biến đổi xảy ra trong vùng Ser³³⁷ – Thr – Met – Lys và Leu⁵⁴⁶ – Lys – Ser – Gly ở gene *pbp2x* gây ra sự kháng ở mức khá cao (MIC = 0,125 - 4 μ g/ml).

Chúng tôi sử dụng quy trình PCR – SSCP mà chủ chốt là kỹ thuật SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) - một kỹ thuật được sử dụng để phát hiện đột biến điểm trên một trình tự DNA để phát hiện đột biến trên các trình tự của gene *pbp2x* của một số chủng *S. pneumoniae* lâm sàng kháng penicillin.

VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi khuẩn : Các chủng *S.pneumoniae* nhạy và kháng penicillin do bệnh viện Nhi Đồng I Thành phố Hồ Chí Minh cung cấp được bảo quản trong môi trường BHI+glycerol 5% ở -28° C. Các chủng này sẽ được cấy lên môi trường BHIA có bổ sung 5% máu cừu để thu sinh khối làm nguyên liệu cho tách chiết DNA.

Primer dùng cho phản ứng PCR : F₁ 5'-GGACTTTGTGTGGCGTGATAT-3', R₁ 5'-TCAAGGAGACTCRTYCCAAC-3', F₂ 5'-ATGATGACHTTHTYACAAGGGTT-3', R₂ 5'-CATACCGCCATCRTRRGCAAT-3', F₃ 5'-CATTTGGACARGGRATTC-3', R₃ 5'-

GTGGTTATACATRGTTCCATA-3', F₄ 5'-GTCATGCTGGARCCWAAATTTAT-3', R₄ 5'-CTGAAWAATGYTCAGGYTGTTG-3'. Các primer được chúng tôi thiết kế dựa trên vùng transpeptidase của gene *pbp2x* nhờ các phần mềm AnnHyb 4.0 beta 9 (Olivier Friard) và phần mềm ClustalX 1.81.

Phương pháp tách chiết DNA theo Boom và cộng sự (1997) : Trộn 100µl dịch vi khuẩn với 900µl L₆ (20g guanidinium thiocyanate, 100ml Tris-HCl pH 6.4, 22ml EDTA 0.2M pH 8, 2.6g Triton X-100), vortex 30 giây. Cho thêm 30µl silica, vortex 30 giây, lắc đều ở nhiệt độ phòng 15 phút, ly tâm 13000 vòng/phút trong 15 giây, loại bỏ dịch nổi. Thu phần cặn, rửa cặn DNA hai lần với 2ml dung dịch L₂ (20g guanidinium thiocyanate, 100ml Tris-HCl pH 6.4), rửa tiếp hai lần với 2ml ethanol 70%, rửa lần cuối với 1ml acetone, để khô cặn. Dung dịch DNA với 30µl nước cất trong 15 phút ở 60⁰ C, ly tâm 13000 vòng/phút trong 2 phút. Thu dịch DNA, giữ ở -20⁰ C.

Phương pháp PCR : được thiết lập trong 25µl với 2mM MgCl₂, 1.5µl mỗi loại primer xuôi-ngược, 200µM mỗi loại deoxyribonucleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 2.5 đơn vị *Taq* polymerase và dung dịch đệm 1X, 8.5 µl DNA. Chương trình PCR I : 95⁰C-15'; 20 chu kỳ gồm: 94⁰C-30", 50⁰C-30", 72⁰C-45"; 72⁰C-6'; sản phẩm PCR I được pha loãng 10 lần dùng cho PCR II : 95⁰C-15'; 36 chu kỳ gồm: 94⁰C-30", 45⁰C-30", 72⁰C-30"; 72⁰C-10'.

Phương pháp lai phân tử Southern Blotting : Các sản phẩm PCR *pbp2x* sau điện di và biến tính được chuyển lên màng lai nylon (Hybond N⁺ - Amersham) và tiến hành lai với mẫu dò đánh dấu bằng DIG - dUTP. Bộ Kit DIG Nucleic Acid Detection (Boehringer Mannheim) được sử dụng để phát hiện phân tử lai.

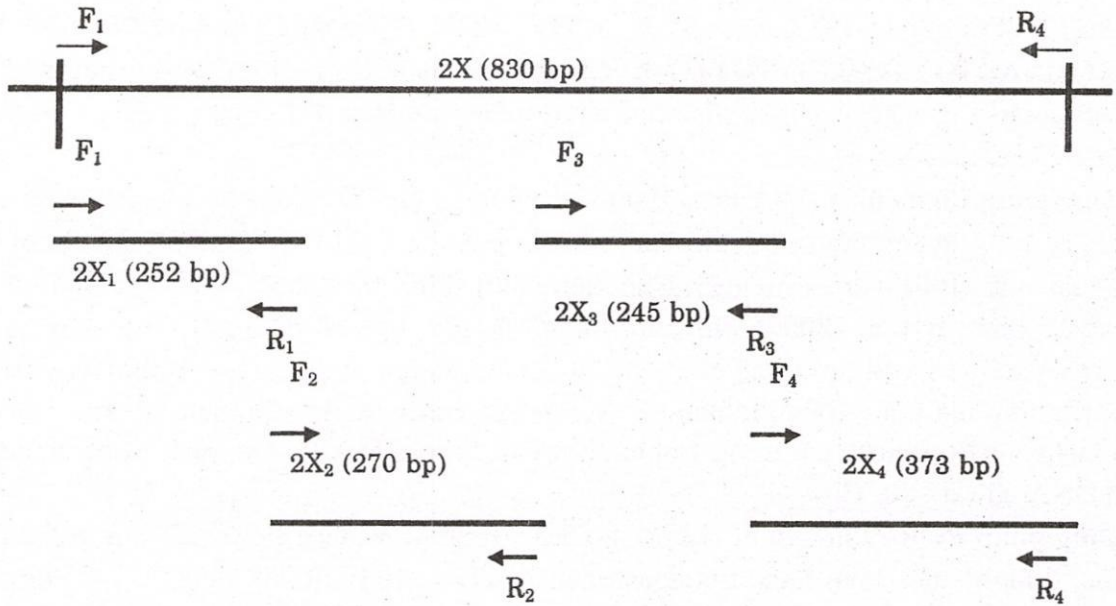
Phương pháp SSCP : Sản phẩm PCR *pbp2x* được biến tính bằng nhiệt và làm lạnh đột ngột. Các mẫu này được điện di trên gel polyacrylamide 8% (4ml gel polyacrylamide 40%, 1ml glycerol, 1ml TBE 10X, 14ml nước cất 2 lần, 27ml dung dịch APS 25%, 17ml TEMED) ở hiệu điện thế 250V. DNA trên gel sau khi điện di được phát hiện bằng phương pháp nhuộm bạc : ngâm gel 20 phút trong ethanol 10%, 5 phút trong HNO₃ 1%, 20 phút trong AgNO₃ 0.25% - formaldehyde 0.37%, rửa bản gel ba lần với nước cất, cho vào Na₂CO₃ 0.1% - formaldehyde 0.0063% đến khi vạch DNA hiện ra rõ, dùng phản ứng bằng dung dịch acetic acid 5%.

KẾT QUẢ - THẢO LUẬN:

Kết quả PCR thu nhận các trình tự DNA từ gene *pbp2x* ở *S.pneumoniae*

Vị trí bắt cặp của các primer đã thiết kế trên gene *pbp2x* và kích thước sản phẩm PCR tạo ra được trình bày trong hình 1.

Các primer thiết kế như trên được sử dụng để nhân bản 05 trình tự từ gene *pbp2x* ở chủng *S. pneumoniae* kháng SR55 để kiểm tra hiệu quả hoạt động của chúng. Kết quả (hình 2) cho thấy tín hiệu dương tính mạnh, không có sản phẩm ký sinh và kích thước các sản phẩm PCR phù hợp với kích thước dự kiến là 830bp (2X), 252bp (2X₁), 270bp (2X₂), 245bp (2X₃), 373bp (2X₄). Điều này chứng tỏ các primer và chương trình PCR thiết kế hoạt động tốt.



Hình 1 : Sơ đồ bắt cặp các primer trên gene *pbp2x* và các sản phẩm PCR dự kiến



Hình 2 : Kết quả điện di trên gel agarose 2% các sản phẩm PCR I và II từ chủng *S.pneumoniae* kháng SR55.

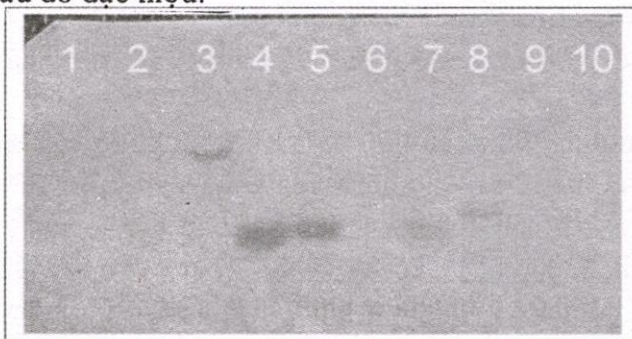
4: Thang Φ X 174 Hae-III;

7: Mẫu chứng âm;

1,2,3,5,6 : Đoạn 2X (830bp), đoạn 2X1 (252bp), đoạn 2X2 (270bp), đoạn 2X3 (245bp), đoạn 2X4 (373bp).

Kết quả Southern blot trên các sản phẩm PCR thu nhận được

Tính đặc hiệu của các sản phẩm PCR được kiểm tra qua kết quả Southern blot với mẫu dò đặc hiệu.



Hình 3 : Kết quả Southern blot các sản phẩm PCR từ gene *pbp2x* của chủng SR55

5 : Thang Φ X 174 Hae-III;

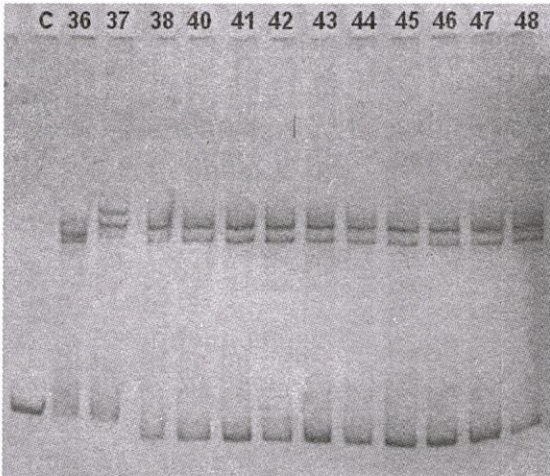
1,2,9,10 : Sản phẩm PCR từ HBV, HPV, 16SrRNA *E. coli*, WSSV

3,4,6,7,8 : Đoạn 2X, 2X₁, 2X₂, 2X₃, 2X₄

Kết quả (hình 3) cho thấy chỉ các sản phẩm PCR nhân bản với các primer thiết kế cho tín hiệu lai dương tính. Điều này chứng tỏ các sản phẩm PCR thu nhận được nhân bản từ gene *pbp2x* ở *S. pneumoniae*.

Kết quả SSCP trên các trình tự gene *pbp2x* ở *Streptococcus pneumoniae*

Chúng tôi tiến hành nhân bản các trình tự gene *pbp2x* từ 21 chủng *S. pneumoniae* kháng và 01 chủng nhạy. Các sản phẩm PCR từ các chủng kháng sau đó được phân tích bằng kỹ thuật SSCP nhằm xác định các trình tự mang đột biến điểm khi so sánh với dạng SSCP của chủng nhạy. Một kết quả minh họa được trình bày trong hình 4 cho thấy so với chủng chứng 37, có hai dạng SSCP khác : (1) chủng 36, (2) các chủng còn lại.



Hình 4 : Kết quả phân tích SSCP đoạn 2X₃ của các chủng 36, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48

C : mẫu 2X₃ không biến tính,
 Các giếng còn lại : số của giếng tương ứng với số thứ tự của chủng vi khuẩn,
 37 là chủng nhạy.

Các sản phẩm PCR 2X₁, 2X₂, 2X₃, và 2X₄ của 21 chủng *S. pneumoniae* kháng cũng được tiến hành khảo sát tương tự. Các phân tích SSCP cho phép dự đoán sự hiện diện của các đột biến điểm trên trình tự khảo sát và kết quả tổng kết được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2 : Số lượng đột biến dựa trên kết quả SSCP từ 20 chủng *S. pneumoniae*

| Số đột biến điểm dự đoán | Chủng |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Đột biến trên 3 đoạn 2X ₂ , 2X ₃ , 2X ₄ | 48 |
| Đột biến trên cả 4 đoạn trình tự | 36,38,40,41,42,43,44,45,46,50,51,52,55,58,59,60,61,63,64, |

Dựa vào kết quả phân nhóm SSCP so với chủng nhạy dùng làm chứng, cả 20 chủng *S. pneumoniae* kháng penicillin khảo sát đều có mang nhiều hơn hai đột biến điểm trên trình tự 830 bp từ gene *pbp2x* nghiên cứu. Các kết quả này đang được khẳng định bằng kỹ thuật giải trình tự (sequencing).

KẾT LUẬN

- 1- Quy trình PCR-SSCP cho phép phát hiện sự hiện diện của đột biến điểm trên trình tự DNA nghiên cứu
- 2- 20 chủng *S. pneumoniae* kháng penicillin khảo sát có mang trên hai đột biến điểm trên trình tự gene *pbp2x* nghiên cứu.

Lời cảm ơn: Chúng tôi chân thành cảm ơn Khoa Vi sinh - Bệnh viện Nhi Đồng I Thành phố Hồ Chí Minh đã giúp phân lập và cung cấp các chủng *Streptococcus pneumoniae* kháng penicillin cho đề tài nghiên cứu của chúng tôi.

**DETECTION OF POINT MUTATIONS ON *PBP2X* GENE OF SOME
PENICILLIN RESISTANT *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* STRAINS
BY PCR-SSCP**

**Ta Van quang, Phan Minh Duy, Dong Sy Huy,
Nguyen Hoang Chuong, Ho Huynh Thuy Duong**

ABSTRACT: We used PCR and SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) methods to detect point mutations in a 830 bp-fragment of *pbp2x* gene in 20 *Streptococcus pneumoniae* penicillin-resistant strains. Results showed that all the strains investigated bore more than two nucleotide modifications compared with the susceptible one.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bryan L.E. & Godfrey A.J. β -lactam antibiotics: Mode of action and bacterial resistance, in *Antibiotics in Laboratory Medicine*, edited by V. Lorian, Williams and Wilkins, 3rd ed, 599-664. 1991.
2. Hakenbeck R., Grebe T., Zahner D. & Stock J. β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae* : penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *Molecular Microbiology*, **33**:673-678. 1999.
3. Yasuko Asahi, Yasuo Takeuchi, and Kimiko Ubukata. Diversity of Substitutions Within or Adjacent to Conserved Amino Acid Motifs of Penicillin-Binding Protein 2X in Cephalosporin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. **43**. 1252–1255. 1999.