

TÁCH DÒNG VÀ XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ GEN *slo* CỦA VI KHUẨN *Streptococcus pyogenes* ĐƯỢC PHÂN LẬP TẠI VIỆT NAM

VÕ VIỆT CƯỜNG⁽¹⁾, PHẠM THỊ HÀ GIANG⁽¹⁾,
NGUYỄN NHƯ NGHĨA⁽¹⁾, NGUYỄN VĂN MINH⁽²⁾

1. MỞ ĐẦU

Streptococcus pyogenes thuộc liên cầu khuẩn nhóm A, là một trong những tác nhân chính gây bệnh viêm đường hô hấp trên như viêm họng, viêm amidan. Theo ước tính hàng năm trên thế giới có khoảng 700 triệu trường hợp nhiễm liên cầu nhóm A, phần lớn các trường hợp xảy ra ở trẻ em lứa tuổi 6 - 15 [7]. Viêm họng do liên cầu có thể gây nên các biến chứng nguy hiểm, gây tử vong cao như thấp tim, thấp khớp, viêm cầu thận hoặc để lại các di chứng ở van tim rất nặng ảnh hưởng đến khả năng lao động cũng như sức khỏe đến suốt đời [1, 6].

Trong tế bào *S. pyogenes*, protein SLO có trọng lượng phân tử khoảng 63,6 kDa, gồm 571 axit amin trong đó 33 axit amin đầu là peptide tín hiệu (signal peptide) có chức năng định hướng SLO ra ngoài màng tế bào, trình tự này bị cắt khỏi phân tử SLO trước khi tiết ra ngoài môi trường. Gen mã hóa cho kháng nguyên SLO gồm 1716 nucleotit, được xác định trình tự lần đầu tiên vào năm 1987 [4]. Trước đây, SLO được sản xuất bằng cách nuôi *S. pyogenes* trong môi trường BHI, sau đó kháng nguyên được tách chiết khỏi môi trường nuôi cấy bằng tua phân đoạn với amoni sulfat, tinh sạch bằng sắc ký trao đổi ion và sắc ký lọc gel. Phương pháp này thường tốn nhiều thời gian, cho hiệu suất và độ sạch không cao [2, 3].

Gần đây, một số nghiên cứu sản xuất kháng nguyên SLO bằng công nghệ ADN tái tổ hợp đã được tiến hành trên các hệ biểu hiện *E. coli*, *Bacillus*. Kháng nguyên SLO thương mại hiện nay cũng được sản xuất bằng con đường tái tổ hợp [2, 5]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tách dòng và xác định trình tự gen *slo* của vi khuẩn *S. pyogenes* được phân lập tại Việt Nam, để làm cơ sở cho nghiên cứu biểu hiện gen và sản xuất kháng nguyên SLO tái tổ hợp..

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu, hóa chất

- Chủng liên cầu khuẩn *S. pyogenes* (ký hiệu Slo_B37) mang gen *slo* được phân lập tại Việt Nam, do Phòng Y dược, Viện Y sinh nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga cung cấp.

- Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α do hãng Invitrogen (Mỹ) cung cấp được sử dụng để tách dòng gen *slo*.

- Plasmid pJET1.2/blunt do hãng Thermo (Mỹ) sản xuất được sử dụng làm vector tách dòng.

- Hóa chất sử dụng trong thí nghiệm là những hóa chất tinh khiết được sử dụng trong các phòng thí nghiệm sinh học phân tử.

- Cặp mồi nhân gen *slo* được thiết kế dựa trên trình tự gen *slo* trên Ngân hàng gen quốc tế (GenBank) có mã số NC_002737, chiều dài đoạn gen *slo* có kích thước khoảng 1,6 kb. Trình tự cặp mồi như sau:

SLO F: 5'-ACCATGGATACTGCTAGTACAGAAACC-3'

SLO R: 5'-TCTCGAGGTAATCGAACCATATGGGCT-3''

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Tách chiết ADN tổng số tế bào vi khuẩn

Chuyển khuẩn lạc *S. pyogenes* vào 10 ml môi trường BHI ở 37°C, 5% CO₂, nuôi qua đêm. Sau đó, tế bào được thu lại bằng ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút. Hòa tế bào vi khuẩn vào 352,5 µl TE; bổ sung 2,5 µl lysozyme (100 mg/ml); 3 µl mutanolysin (1 mg/ml); ủ ở 37°C trong 10 phút. Bổ sung 3 µl protease K (20 mg/ml); 30 µl SDS 10%; ủ ở 37°C trong 30 phút. Bổ sung 140 µl TE; 180 µl NaCl 5M lắc nhẹ và ủ tiếp ở 65°C trong 10 phút. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút để thu dịch nổi. Protein của tế bào được loại bỏ bằng hỗn hợp phenol : chloroform (1 : 1). ADN hệ gen nằm ở pha trên được tủa lại bằng cồn tuyệt đối và được hòa trong 40 µl TE.

- Kỹ thuật PCR nhân gen *slo*

Gen *slo* được nhân lên bằng kỹ thuật PCR với chu trình như sau: Biến tính ADN khuôn ở 95°C trong 3 phút, sau đó thực hiện liên tiếp 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước: Bước 1 - Biến tính khuôn ở 94°C trong 1 phút; bước 2 - gắn mồi lên khuôn ở 52°C trong 45 giây; bước 3 - tổng hợp, kéo dài chuỗi ở 72°C trong 50 giây. Phản ứng kết thúc ở 72°C trong 10 phút, giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên agarose 1,5%.

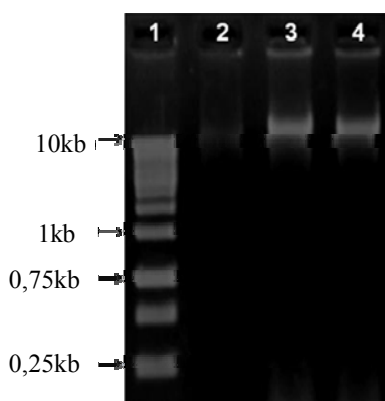
Các kỹ thuật sinh học phân tử: Nối các đoạn gen, tách chiết plasmid, biến nạp plasmid vào tế bào *E. coli*, điện di sản phẩm trên agarose được tiến hành theo phương pháp của Samrook và Russel (2001) [8]. Trình tự đoạn gen *slo* được xác định trên máy giải trình tự ABI 3110 với hai mồi pJET1.2 sequencing F và pJET1.2 sequencing R. Kết quả giải trình tự gen được xử lý bằng chương trình BioEdit; công cụ BLAST (NCBI) được sử dụng để so sánh trình tự nucleotit và axit amin.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách chiết ADN tổng số từ tế bào vi khuẩn

S. pyogenes là vi khuẩn Gram dương, có thành tế bào dày với thành phần chủ yếu là peptidoglycan. Dưới tác dụng của lysozyme và mutanolysin, thành tế bào bị phá hủy do các liên kết β(1-4) giữa các đơn vị cấu trúc cấu tạo nên peptidoglycan là axit N-acetyl muramic và N-acetyl glucosamin sẽ bị cắt đứt. Trong môi trường nhược trương, tế bào vi khuẩn ở thể nguyên sinh (protoplasm) dễ dàng bị vỡ tung, giải phóng các thành phần như protein, ADN, ARN... Toàn bộ protein bị phân cắt bởi

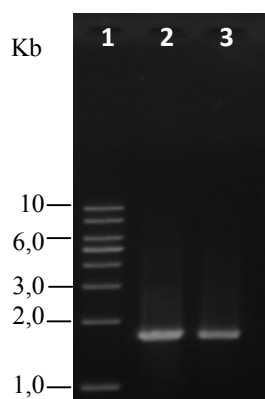
protease K không đặc hiệu và được tách khỏi ADN tổng số bằng hỗn hợp phenol/chloroform. Sau khi ly tâm, dung dịch chứa ADN tổng số nằm ở pha trên được thu nhận và rửa bằng cồn tuyệt đối. Sản phẩm ADN tổng số được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%. Kết quả điện di (hình 1) cho thấy có một băng lớn nhất và rõ nét gần với giếng truyền mẫu, chứng tỏ ADN tổng số của *S. pyogenes* đã được tách chiết thành công, có kích thước đủ lớn và có độ tinh sạch cao. ADN tổng số sẽ được sử dụng để nhân gen *slo* bằng kỹ thuật PCR.



Hình 1. Điện di ADN tổng số trên agarose 0,8%
1: Marker 1kb; 2-4: Các mẫu ADN tổng số

3.2. Phân lập gen *slo*

Sử dụng cặp mồi SLO F và SLO R để nhân gen *slo* và sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên agarose 1,5%. Kết quả thu được trên hình 2 cho thấy sản phẩm PCR chỉ có một băng ADN duy nhất, sắc nét, có kích thước đúng như kích thước của gen *slo* được tính toán theo lý thuyết khoảng 1,6 kb. Như vậy, phản ứng PCR để nhân gen *slo* là đặc hiệu, chương trình PCR và nồng độ các chất tham gia phản ứng là phù hợp, kết quả bước đầu cho thấy đã khuếch đại thành công gen *slo* bằng kỹ thuật PCR. Sản phẩm PCR được sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo.

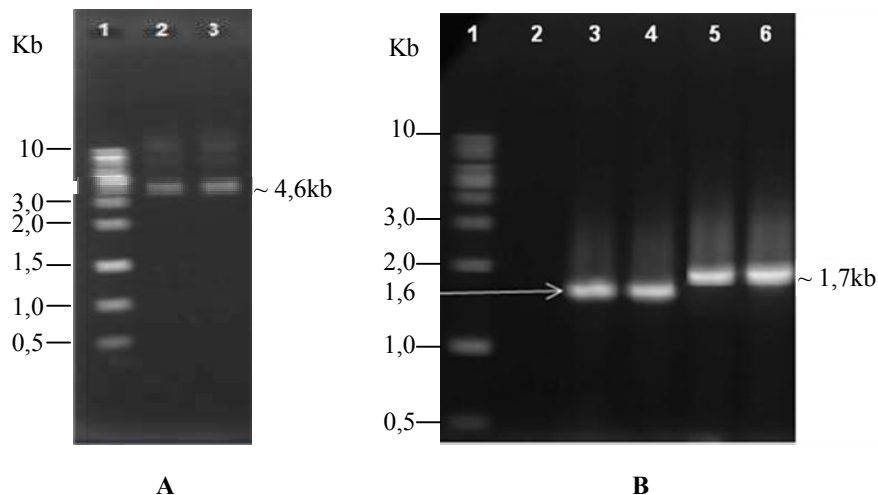


Hình 2. Sản phẩm PCR nhân gen *slo* trên agarose 1,5%
1: Marker 1kb; 2,3: Sản phẩm PCR

3.3. Nhân dòng gen *slo* trong vector pJET1.2/blunt

Sản phẩm PCR gen *slo* được tinh sạch và gắn vào vector pJET1.2/blunt theo bộ kit Clone Jet của hãng Thermo. Bước đầu sản phẩm PCR được loại bỏ đầu dính bởi enzyme ADN blunting ở 70°C trong 5 phút, sau đó hỗn hợp được bổ sung vector pJET1.2/blunt và enzyme T4 ADN ligase. Sau khi đoạn gen *slo* được gắn vào vector pJET1.2, lấy 10 µl sản phẩm để biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5α. Thể biến nạp được cấy trải trên đĩa petri chứa môi trường LB đặc có 50 µg/ml ampicillin và nuôi trong tủ ấm 37°C cho đến khi quan sát thấy sự hình thành các khuẩn lạc.

Để xác định thể biến nạp mang đúng plasmid tái tổ hợp pJETSlo, chọn ngẫu nhiên một số khuẩn lạc mọc lên từ đĩa thạch để tách và kiểm tra plasmid. Vector pJET1.2/blunt có kích thước xấp xỉ 3,0 kb, vì vậy plasmid tái tổ hợp pJETSlo sẽ có kích thước khoảng 4,6 kb do được chèn thêm đoạn gen *slo*. Kết quả điện di sản phẩm tách plasmid cắt mở vòng xuất hiện băng sáng đậm, có kích thước khoảng 4,6 kb (hình 3A). Như vậy, plasmid thu được từ thể biến nạp đã được chèn đoạn gen *slo*. Để kiểm tra đoạn gen *slo* có thực sự được gắn vào plasmid hay không, tiếp tục tiến hành kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mồi nhân đoạn gen *slo* (SLO F và SLO R) và cặp mồi của vector pJET1.2. Theo lý thuyết, sản phẩm PCR với cặp mồi gen *slo* có kích thước khoảng 1,6 kb, với cặp mồi vector pJET1.2 có kích thước khoảng 1,7 kb. Kết quả kiểm tra cho thấy sản phẩm PCR đều xuất hiện băng đúng kích thước theo lý thuyết (hình 3B). Bước đầu có thể khẳng định gen *slo* đã được tách dòng thành công.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm plasmid tái tổ hợp gen *slo* (A) và PCR với cặp mồi gen *slo*, cặp mồi pJET1.2 (B).

1A, 1B: Marker 1kb; 2A, 3A: Plasmid tái tổ hợp pJETSlo
2B: Đối chứng âm (mồi nhân đoạn gen); 3B, 4B: Sản phẩm PCR với cặp mồi SLO F và SLO R; 5B, 6B: Sản phẩm PCR với cặp mồi vector pJET1.2.

3.4. Xác định trình tự gen *slo*

Plasmid tái tổ hợp pJETslo được sử dụng để giải trình tự gen *slo*, với cặp mồi vector pJET1.2. Kết quả giải trình tự được phân tích bằng phần mềm BioEdit, đoạn gen *slo* được giải trình tự có kích thước là 1595 nucleotit, mã hóa cho 531 axit amin của protein SLO. Khi so sánh với trình tự gen *slo* từ chủng *S. pyogenes* phân lập ở Việt Nam (Slo_B37) với trình tự gen *slo* trên GenBank có mã số NC_002737, kết quả so sánh cho thấy trình tự nucleotit của hai gen này có 20 vị trí sai khác và mức độ tương đồng giữa hai trình tự này là 99% (hình 4).

Slo_B37	1	ACTGCTAGTACAGAAACCAACGACAAATGAGCAACCAAGCCAGAAAGTAGTGAGCTA	60
NC_002737	112	ACTGCTAGTACAGAAACCAACGACAAATGAGCAACCAAGCCAGAAAGTAGTGAGCTA	171
Slo_B37	61	ACTACCGAAAAAGCAGGTCAGAAAAATGGATGATATGCTTAGCTCTAACGATATGATTAAAG	120
NC_002737	172	ACTACCTGAAAAAGCAGGTCAGAAAAATGGATGATATGCTTAGCTCTAACGATATGATTAAAG	231
Slo_B37	121	CTTGCTCCCAAGAAATGCGCTAGAAATCTGAGAAAAAGAGAAAAAAGTCAGAAAGAC	180
NC_002737	232	CTTGCTCCCAAGAAATGCGCTAGAAATCTGAGAAAAAGAGAAAAAAGTCAGAAAGAC	291
Slo_B37	181	AAAAAAAGAGCGAAGAGATCACACTGAGAAATCAATGACAAGATTTATTCTACTAAAT	240
NC_002737	292	AAAAAAAGAGCGAAGAGATCACACTGAGAAATCAATGACAAGATTTATTCTACTAAAT	351
Slo_B37	241	TATAATGAGCTTGAGGTACTTGTCTAAAAATGGTGAAACCATTTGAAAAATTTGTTCCTAAAG	300
NC_002737	352	TATAATGAGCTTGAGGTACTTGTCTAAAAATGGTGAAACCATTTGAAAAATTTGTTCCTAAAG	411

Hình 4. So sánh một phần trình tự đoạn gen *slo* được tách dòng với gen *slo* trên Ngân hàng gen

Do có sự khác nhau về trình tự nucleotit giữa 2 gen (Slo_B37 và NC_002737) nên chúng tôi đã tiến hành dịch mã và so sánh trình tự axit amin suy diễn từ gen Slo_B37 với trình tự axit amin SLO mã số NP_268546 (được dịch mã từ gen NC_002737) trên GenBank. Kết quả dịch mã và so sánh trình tự của hai chuỗi axit amin này cho thấy, tuy đoạn gen Slo_B37 có đến 20 vị trí nucleotit sai khác so với gen NC_002737, nhưng khi dịch mã sang axit amin thì chỉ có 3 vị trí axit amin khác nhau, tại vị trí thứ 29 trên trình tự axit amin của NP_268546 là Threonine (T) trong khi đó của Slo_B37 là Methionine (M), ở vị trí thứ 34 của NP_268546 là Asparagine (N) thì của Slo_B37 là Serine (S) và ở vị trí thứ 413 của NP_268546 là Threonine (T) thì của Slo_B37 cũng là Serine (S) (hình 5).

Slo_B37	1	TASTETTTTNEQPKPESELTEKAGQKMDMLSSNDMIKLAPKEMPLSAEKEEKKSED	60
NP_268546	1	TASTETTTTNEQPKPESELTEKAGQKTDMLNSNDMIKLAPKEMPLSAEKEEKKSED	60
Slo_B37	61	KKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNIN	120
NP_268546	61	KKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNIN	120
Slo_B37	121	TTPVDISIIDSVTDRTPAALQLANKGFTENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGMGDKATVEV	180
NP_268546	121	TTPVDISIIDSVTDRTPAALQLANKGFTENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGMGDKATVEV	180
Slo_B37	181	NDPTYANVSTAIIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYTESMVYSKSQIEAALNVNSKILDGT	240
NP_268546	181	NDPTYANVSTAIIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYTESMVYSKSQIEAALNVNSKILDGT	240
Slo_B37	241	LGIDFKSISKGEKKVMIAAYKQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSNAPPL	300
NP_268546	241	LGIDFKSISKGEKKVMIAAYKQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSNAPPL	300
Slo_B37	301	FVSNVAYGRTVFVKLETSSKSNDEAFAAALKGTDVKTNGKYSIDILENSSFTAVVLGGD	360
NP_268546	301	FVSNVAYGRTVFVKLETSSKSNDEAFAAALKGTDVKTNGKYSIDILENSSFTAVVLGGD	360
Slo_B37	361	AAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRSEYVETTS	420
NP_268546	361	AAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRTYVETTS	420
Slo_B37	421	TEYTSGKINLSHQGAYVAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDNNWYSKTSFPSTVIPLG	480
NP_268546	421	TEYTSGKINLSHQGAYVAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDNNWYSKTSFPSTVIPLG	480
Slo_B37	481	ANSRNIRIMARECTGLAWEWWRKVIDERDVKLSKEINVNISGSTLSPYGSI	531
NP_268546	481	ANSRNIRIMARECTGLAWEWWRKVIDERDVKLSKEINVNISGSTLSPYGSI	531

Hình 5. Trình tự axit amin được dịch mã từ đoạn gen *slo* được tách dòng và trình tự SLO trên Ngân hàng gen

Với mục đích sản xuất kháng nguyên SLO tái tổ hợp để chế tạo kit phát hiện ASLO, chúng tôi đã phân lập và tách dòng đoạn gen *slo* từ chủng vi khuẩn *S. pyogenes* được phân lập ở Việt Nam. Trong quá trình nhân gen, một số nucleotit mã hóa cho trình tự dẫn của protein SLO đã được loại bỏ. Do vậy, số lượng nucleotit trên đoạn gen chúng tôi nhân dòng có kích thước 1595 bp mã hóa cho 531 axit amin. Theo Kehoe (1987), quyết định kháng nguyên (epitop) của SLO nằm trong vùng axit amin 234 - 571, vùng này nằm về phía sau của SLO [4]. Do đó, việc một số axit amin ở đầu N sẽ không ảnh hưởng đến tính kháng nguyên của SLO và đoạn gen thu được trong nghiên cứu có thể sử dụng để biểu hiện và sản xuất kháng nguyên SLO tái tổ hợp.

4. KẾT LUẬN

Đã tách dòng và xác định trình tự đoạn gen *slo* mã hóa cho kháng nguyên SLO từ liên cầu khuẩn *S. pyogenes* được phân lập ở Việt Nam; đoạn gen *slo* có kích thước 1595 bp, có 20 vị trí nucleotit sai khác so với đoạn gen NC_002737 trên Ngân hàng gen quốc tế và mức độ tương đồng về nucleotit giữa hai trình tự này là 99%.

Trình tự axit amin được dịch mã từ đoạn gen *slo* có 3 sai khác so với trình axit amin của NP_268546 trên Ngân hàng gen quốc tế tại các vị trí T29M, N34S và T413S.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ben-Chetrit E., Moses A. E., Agmon-Levin N., Block C., *Serum levels of anti-streptolysin O antibodies: their role in evaluating rheumatic diseases*, Int J Rheum Dis, 2012, 15(1):78-85.
2. Camprub S., Bruguera M., Canalias F., *Purification of recombinant histidine-tag streptolysin O using immobilized metal affinity expanded bed adsorption (IMA-EBA)*, Int J Biol Macromol, 2006, 38:134-139.
3. Canalias F., Viver J., Beleta J., Gonzalez-Sastre F., Javier Gella F., *Purification and characterization of streptolysin O from Streptococcus pyogenes*, Int J Biochem, 1992, 24(7):1073-9.
4. Kehoe M. A., Miller L., Walker J. A., Boulnois G. J., *Nucleotide sequence of the streptolysin O (SLO) gene: structural homologies between SLO and other membrane-damaging, thiol-activated toxins*, Infect Immun, 1987, 55(12):3228-3232.
5. Kehoe M., Pinkney M., *Streptolysin O antigen derivatives their production and uses*, U.S. Patent. 5700648, 1997.
6. Lee J. L., Naguwa S. M., Cheema G. S., Gershwin M. E., *Acute rheumatic fever and its consequences: A persistent threat to developing nations in the 21st century*, Autoimmunity, 2009, 9, p.117-123.
7. Poradosu R. C., Kasper D. L., *Group A Streptococcus epidemiology and vaccine implications*, CID, 2007, 45, p.863-5.
8. Sambrook J., Russell D. W., *Molecular Cloning A, Laboratory manual* (3), 2001, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

SUMMARY

CLONING AND SEQUENCING FOR *slo* GENE OF *Streptococcus pyogenes* ISOLATED IN VIETNAM

Streptococcus pyogenes is a major cause of upper respiratory tract infections such as pharyngitis, tonsillitis. These diseases can cause serious complications, causing high mortality. Antigen streptolysin O (SLO) was used to detect antibodies to streptolysin O (ASLO) in serum of patients with suspected group A *Streptococcus*. This study was carried out to clone and sequence the *slo* gene encoding for SLO of *S. pyogenes* strain isolated in Vietnam (Slo_B37). The results revealed that *slo* gene was cloned and sequenced in size of 1595 nucleotide, with 20 nucleotides differed from NC_002737 fragment on GeneBank and the degree of genetic similarity is 99%. Translated products of the fragment Slo_B37 has differences with sequence of NP_268546 translated from NC_002737 gene in three amino acids at positions: T29M, N34S and T413S.

Từ khóa: Slo gene, Streptococcus pyogenes, streptolysin O, vector pJETslo.

Nhận bài ngày 25 tháng 9 năm 2014

Hoàn thiện ngày 12 tháng 10 năm 2014

⁽¹⁾ *Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga*

⁽²⁾ *Trường Đại học khoa học Tự nhiên, ĐHQG Hà Nội*