

Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật LAMP phát hiện nhanh vi khuẩn *E. coli* gây bệnh tiêu chảy ở người

Trần Thị Thanh Huyền^{1*}, Đinh Đức Thọ², Phạm Thanh Hiền¹, Trần Văn Tuấn¹

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Trường Cao đẳng Y Thái Nguyên

Ngày nhận bài 8/11/2019; ngày chuyển phản biện 15/11/2019; ngày nhận phản biện 12/12/2019; ngày chấp nhận đăng 25/12/2019

Tóm tắt:

Hiện nay, có rất nhiều phương pháp khác nhau để phát hiện vi sinh vật gây bệnh, bao gồm cả những phương pháp truyền thống và phương pháp phân tử hiện đại. Tuy nhiên, trong chẩn đoán tiêu chảy do vi khuẩn *Escherichia coli*, các phương pháp phân lập trên môi trường chọn lọc, thử các tính chất sinh, hóa giúp phát hiện vi khuẩn *E. coli* nhưng không thể phân biệt giữa các vi khuẩn *E. coli* hội sinh cư trú bình thường ở đường ruột với các vi khuẩn *E. coli* mang gen độc lực gây bệnh. Bài báo này đề cập đến phương pháp LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) khuếch đại DNA với độ đặc hiệu và độ nhạy cao được ứng dụng để phát hiện nhanh vi khuẩn *E. coli* ở giới hạn phát hiện là 15 pg, cao gấp hơn 100 lần so với phương pháp PCR. Một bộ 4 cặp mồi đặc hiệu được thiết kế để khuếch đại đoạn gen *eae* là một trong những gen độc lực của vi khuẩn *E. coli* có kích thước 288 bp trong DNA genome vi khuẩn và với sự có mặt chất chỉ thị kim loại calcein ($C_{30}H_{26}N_2O_{13}$). Phản ứng diễn ra ở điều kiện đẳng nhiệt 60°C trong khoảng 30 đến 60 phút, sản phẩm phản ứng là các băng DNA phân bố giống như dạng bậc thang với kích thước thấp nhất là băng cơ sở 288 bp khi điện di trên gel agarose. Kết quả phản ứng có thể được quan sát bằng mắt thường do sự thay đổi màu của dung dịch phản ứng từ màu cam (âm tính) sang màu xanh huỳnh quang (dương tính). Do đó đây là một kỹ thuật nhạy và đặc hiệu, có khả năng phát hiện nhanh, chính xác vi khuẩn *E. coli* gây bệnh có mang gen độc tố *eae*. Phương pháp phát hiện này mở ra tiềm năng ứng dụng trong nghiên cứu cơ bản về y học và được phẩm, vệ sinh môi trường, xét nghiệm điểm chăm sóc...

Từ khóa: calcein, chỉ thị kim loại, *E. coli*, LAMP, PCR, tiêu chảy.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

Tiêu chảy là bệnh có thể gặp ở mọi lứa tuổi, ở người lớn bệnh thường ít nguy hiểm đến tính mạng nhưng gây ảnh hưởng lớn đến sức khỏe, khả năng lao động và sinh hoạt của người bệnh. Tiêu chảy rất nguy hiểm đối với trẻ em dưới 5 tuổi, đặc biệt là ở trẻ từ 0 đến 2 tuổi. Theo thống kê của Tổ chức Y tế thế giới, tỷ lệ mắc tiêu chảy trung bình ở trẻ em dưới 5 tuổi là trên 3 lần/trẻ em/năm. Tuy nhiên, ở một số nước đang phát triển, con số này có thể cao tới 12 lần/trẻ em/năm. Tại Việt Nam, một số nghiên cứu cho biết, số lần bị tiêu chảy trong một năm đối với một trẻ là 2,2 lần. Đây là bệnh đứng thứ hai về tỷ lệ tử vong ở trẻ dưới 5 tuổi (sau bệnh nhiễm khuẩn đường hô hấp), trong đó hơn 80% số ca tử vong ở trẻ từ 0-2 tuổi [1, 2]. Nguyên nhân chính gây tử vong khi bị tiêu chảy là do mất nước và điện giải, tiếp theo là suy dinh dưỡng. Suy dinh dưỡng và tiêu chảy tạo thành một vòng xoắn bệnh lý: tiêu chảy dẫn đến suy dinh dưỡng và khi trẻ bị suy dinh dưỡng lại có nguy cơ bị tiêu chảy cao hơn [3].

Tác nhân chính gây bệnh là vi khuẩn *E. coli*, trong đó có nhiều nhóm gây bệnh khác nhau như STEC (shiga toxin producing *E. coli*), ETEC (enterotoxigenic *E. coli*), EPEC (enteropathogenic *E. coli*), EIEC (enteroinvasive *E. coli*), EHEC (enterohemorrhagic *E. coli*), EaggEC (enteroaggregative *E. coli*) và DAEC (diffusely adherent *E. coli*) [4]. Vi khuẩn thường mang các gen độc lực khác nhau như *aggR* (EAEC), *ipaH* (EIEC), *elt* và *est* (ETEC) giúp chúng có thể bám vào niêm mạc ruột, giải phóng yếu tố tan máu hoặc độc tố ruột. Tuy nhiên, trong số các gen độc lực đó gen *eae* (*E. coli* attaching and effacing) mã hóa cho protein *intimin* được xem là gen phổ biến có mặt trong hầu hết các nhóm EPEC, EHEC nhưng không có mặt ở các vi khuẩn *E. coli* thuộc hệ vi khuẩn đường ruột thông thường [5]. Có rất nhiều phương pháp khác nhau để phát hiện sự có mặt của gen *eae* như PCR, real time PCR hoặc microarray..., tuy nhiên kết quả của các phương pháp này thường bị phụ thuộc vào kỹ thuật, thao tác tiến hành và sử dụng các thiết bị đắt tiền.

*Tác giả liên hệ: Email: huyentran0150@gmail.com

Rapid detection of *E. coli* causing diarrheal disease in human by using LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) method

Thi Thanh Huyen Tran^{1*}, Duc Tho Dinh²,
Thanh Hien Pham¹, Van Tuan Tran¹

¹University of Science, Vietnam National University, Hanoi

²Thai Nguyen Medical College

Received 8 November 2019; accepted 25 December 2019

Abstract:

Nowadays, many techniques are used for detecting pathogenic agents, including both traditional methods and modern molecular techniques. However, pathogenic *Escherichia coli* are not distinguishable from other common strains due to their appearance on culture plates or by the results of the usual biochemical tests. In this study, a new method called LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) was applied to amplify DNA with high specificity and sensitivity at the detection limit of 15 pg, which was over 100 times higher than that of the PCR method. Four specific primers were designed to amplify the *eae* gene fragment - one of the toxic genes of *E. coli* with the length of 288 bp. Calcein (C₃₀H₂₆N₂O₁₃) is a fluorescent metal indicator for Magnesium detection. In this case, Calcein was initially quenched by manganese, then it emitted a yellowish-green fluorescence. In *eae* LAMP reaction, a large amount of DNA was synthesized, yielding a large pyrophosphate ion by-product. LAMP-generated pyrophosphate preferentially precipitated manganese, resulting in a complex and visible calcein-magnesium as bright green fluorescence. So a positive reaction was observed by a colour change from orange to green with the naked eyes after completion at 60°C for at least 30 min or under UV light detection. As the signal recognition is highly sensitive, this system enables visual discrimination of results without costly specialized equipment. This detection method reveals a great potential in basic research on medicine and pharmacy, environmental hygiene, point-of-care testing etc.

Keywords: calcein, diarrheal, *E. coli*, LAMP, metal indicator, PCR.

Classification number: 3.5

Năm 2000, Notomi và cộng sự đã phát triển một kỹ thuật mới khuếch đại DNA trên cơ sở nguyên lý khuếch đại của PCR nhưng có độ đặc hiệu và độ nhạy cao gấp nhiều lần so với PCR, quá trình khuếch đại DNA diễn ra ở điều kiện đẳng nhiệt nên không cần phải sử dụng các máy móc hiện đại [6]. Hiện nay, LAMP được xem là một phương pháp phổ biến sử dụng trong chẩn đoán nhanh các tác nhân virus, vi khuẩn và nấm. Với mong muốn tìm ra một phương pháp chẩn đoán nhanh nhưng vẫn đảm bảo độ chính xác, có thể tiến hành bằng các thiết bị đơn giản, dễ dàng áp dụng rộng rãi tại tuyến y tế cơ sở nhằm góp phần nâng cao hiệu quả trong phòng chống, kiểm soát và điều trị vi khuẩn *E. coli* gây tiêu chảy ở người, chúng tôi đã lựa chọn kỹ thuật LAMP để phát hiện gen độc tố *eae* gây tiêu chảy.

Gen *eae* mã hóa cho protein intimin có trọng lượng phân tử là 94-97 kDa là yếu tố độc lực của EPEC cần thiết cho việc tạo tổn thương mô học niêm mạc ruột. Gen *eae* hiện diện ở tất cả các chủng EPEC, EHEC nhưng không có ở những dòng vi khuẩn *E. coli* thuộc hệ vi khuẩn đường ruột thông thường [2]. Đây được xem là một trong những chỉ thị phân tử để phát hiện ra các vi khuẩn *E. coli* gây tiêu chảy ở người.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

- 25 mẫu vi khuẩn được phân lập từ mẫu phân của bệnh nhân tiêu chảy do Khoa Vi sinh, Bệnh viện Trung ương Thái Nguyên cung cấp.

- Các chủng vi khuẩn YTN1, YTN2 là các vi khuẩn *E. coli* không gây bệnh được cung cấp bởi Bộ môn Vi sinh, Trường Đại học Y dược Thái Nguyên.

- Mỗi nhân gen (5'-3'): mỗi nhân gen *eae* bằng kỹ thuật PCR ký hiệu SK1/SK2 (mỗi xuôi CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC; mỗi ngược CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTTCG) của vi khuẩn *E. coli* thiết kế bằng phần mềm Primer 3.

Mỗi nhân gen *eae* bằng kỹ thuật LAMP: F3 (CGACGATTTGGTCGTTGAA); B3 (TGTCATCGGT CATGTTGC); FIB (CAAAATGATCTGCTGACCAGGC TTTTAAAGCATTTATACAGTTCTGAAAGC); BIP (AC AGTGCACCTACCACTTTTAGGTTTTTCATTTTAGTC AGTTTATTCGTGTGA) được thiết kế bằng phần mềm PrimerExplorer V4.

Phương pháp

Tách chiết DNA hệ gen của vi khuẩn: vi khuẩn sau khi được nuôi trong môi trường LB ở 28°C trong 18 giờ, thu sinh khối. Chuyển 1,5 ml dịch nuôi cấy vào ống eppendorf và ly tâm ở 5000 vòng/phút trong 7 phút, thu tế bào. Tế bào được hòa tan trong 0,5 ml đệm TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM

EDTA, pH 8), ly tâm thu tế bào [5]. Bổ sung 0,5 ml TE, 3 μ l RNase, 2 μ l lysozyme, trộn đều và để ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Thêm 30 μ l SDS 10%, 3 μ l proteinase K trộn đều, ủ ở 37°C trong 60 phút. Bổ sung 180 μ l 5 M NaCl, ủ ở 65°C trong 10 phút, ly tâm thu dịch nổi ở trên. Chiết DNA hai lần bằng hỗn hợp Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25:24:1), ly tâm thu pha trên. DNA genome được rửa trong cồn 70% ở -20°C trong 30 phút. Ly tâm thu rửa và làm khô, sau đó bổ sung 40 μ l TE để hòa tan DNA genome. Điện di kiểm tra sản phẩm DNA genome sau tách chiết trên gel 0,8% agarose.

Phản ứng PCR: để có thể khuếch đại đoạn gen *eae* bằng kỹ thuật PCR, chúng tôi đã thiết kế cặp mồi dựa trên trình tự đoạn gen *eae* trên genome của vi khuẩn *E. coli*.

Thành phần phản ứng PCR (25 μ l): 10x Taq polymerase buffer (Fermentas), 1,5 mM $MgCl_2$, 2,5 mM dNTP, 100 μ M mỗi xuôi, 100 μ M mỗi ngược, 0,5 IU Taq polymerase, 50 ng DNA, dH_2O cho đến 25 μ l.

Chu trình nhiệt: (1) Biến tính DNA ở nhiệt độ 94°C trong 4 phút. (2) Khuếch đại gen *eae* trong 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước. Bước 1: biến tính sợi khuôn DNA ở 94°C trong 30 giây. Bước 2: mồi bắt cặp bổ sung với đoạn gen tương đồng trên sợi khuôn ở 45°C trong 40 giây. Bước 3: tổng hợp kéo dài chuỗi ở 72°C trong 1 phút 50 giây. (3) Phản ứng kết thúc ở 72°C trong 5 phút 30 giây để tạo sợi DNA hoàn chỉnh và ủ mẫu ở 22°C.

Phản ứng LAMP: LAMP là phản ứng tự tổng hợp DNA vòng khi có mặt của *Bst* DNA polymerase ở điều kiện đẳng nhiệt. Phương pháp này sử dụng 2 cặp mồi khác nhau, vì thế sản phẩm khuếch đại rất đặc hiệu. Phản ứng có tốc độ nhanh, diễn ra trong khoảng thời gian ngắn, chỉ từ 30-60 phút.

Thành phần đệm LAMP 1X gồm (200 mM Tris HCl, pH 8,8, 100 mM KCl, 100 mM $(NH_4)_2SO_4$, 1% Triton 100X, 25 mM $MnCl_2$). Thành phần phản ứng (25 μ l): 5 M Betatin, 1X buffer LAMP, 25 mM dNTPs, 25 mM $MgSO_4$, 2 μ M B3 và F3, 20 μ M BIP và FIP, 8 U/ μ l *Bst* polymerase, 50 ng DNA và dH_2O đến thể tích cuối cùng. Chu trình nhiệt như sau: 64°C trong 60 phút, 80°C trong 10 phút và kết thúc ở 22°C. Sản phẩm LAMP được quan sát bằng điện di trên gel agarose 2% hoặc bằng mắt thường khi có bổ sung chỉ thị kim loại calcein trước phản ứng. Hỗn hợp calcein và Mn^{2+} được thêm vào trước phản ứng. Do sự có mặt của ion Mn^{2+} , calcein liên kết với Mn^{2+} không phát quang, dung dịch có màu da cam. Khi phản ứng khuếch đại DNA xảy ra với sự có mặt của DNA đích, sản phẩm phụ là ion $P_2O_7^{4-}$ được tạo thành sẽ kết hợp với ion Mg^{2+} tạo thành muối $Mg_2P_2O_7$, sau đó ion Mn^{2+} đẩy Mg^{2+} khỏi muối để tạo thành muối $Mn_2P_2O_7$ và giải phóng ion Mg^{2+} . Mg^{2+} tự do trong dung dịch sẽ kết hợp với calcein tạo ra phức hợp calcein-Mg phát quang [7].

Xác định độ đặc hiệu của phản ứng LAMP

Để xác định độ đặc hiệu của phản ứng LAMP với các cặp mồi nhận biết gen *eae* của vi khuẩn *E. coli* gây tiêu chảy, chúng tôi sử dụng các vi khuẩn YTN1, YTN2 là những vi khuẩn *E. coli* không gây bệnh được cung cấp bởi Bộ môn Vi sinh, Trường Đại học Y dược Thái Nguyên, genome được tách chiết theo phương pháp giống như các mẫu bệnh phẩm đã trình bày ở trên để sử dụng làm đối chứng âm trong phản ứng LAMP.

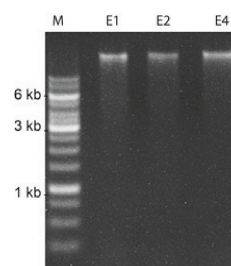
Xác định độ nhạy của phản ứng LAMP

Nồng độ DNA ban đầu được xác định bằng máy nanodrop, sau đó tiến hành pha loãng theo cơ số 10 đến khi đạt các nồng độ pha loãng DNA mong muốn. Xác định ngưỡng nồng độ DNA mà phản ứng vẫn diễn ra.

Kết quả và thảo luận

Tách DNA hệ gen của vi khuẩn

Với mục đích phát hiện vi khuẩn *E. coli* bằng phương pháp phân tử, sử dụng kỹ thuật PCR xác định sự có mặt của gen *eae* trong các chủng vi khuẩn nghiên cứu, trên cơ sở đó thiết lập phản ứng LAMP để phát hiện gen này. DNA của 25 mẫu vi khuẩn nghiên cứu được tách chiết theo phương pháp đã mô tả ở trên. Kết quả tách chiết DNA hệ gen được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8% như hình 1 cho thấy, các băng DNA thu được sáng, rõ, không bị đứt gãy và hoàn toàn sạch. Chất lượng DNA đủ tiêu chuẩn để làm khuôn nhân các gen mong muốn bằng PCR và LAMP (hình 1).



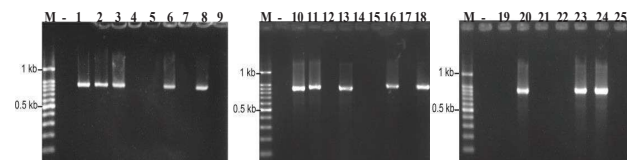
Hình 1. Sản phẩm DNA hệ gen tách chiết từ các chủng vi khuẩn *E. coli* được điện di trên gel agarose 0,8%. M: thang DNA chuẩn 1 kb; E1, E2, E4 là các chủng *E. coli* đại diện.

Phát hiện gen *eae* của các chủng vi khuẩn *E. coli* bằng kỹ thuật PCR

Để xác định sự có mặt của gen *eae*, 25 mẫu DNA của vi khuẩn *E. coli* được sử dụng làm khuôn chạy phản ứng PCR với cặp mồi SK1/SK2 được thiết kế đặc hiệu dựa trên trình tự gen *eae*, theo chu trình nhiệt được mô tả ở phần phương pháp. Sản phẩm sau phản ứng được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose (hình 2).

Sản phẩm sau điện di cho kết quả 13 chủng E1, E2, E3,

E6, E8, E10, E11, E13, E16, E18, E20, E23 và E24 dương tính với gen *eae*, thể hiện các băng DNA sáng, kích thước khoảng 876 bp, phù hợp với những tính toán lý thuyết. Những chủng còn lại có kết quả âm tính với gen *eae*, không thấy xuất hiện băng DNA trên sản phẩm điện di.

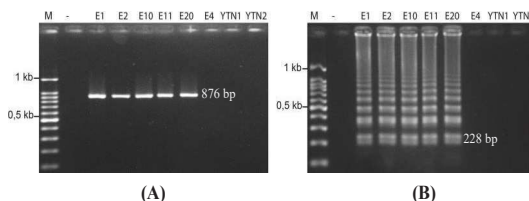


Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR gen *eae* 25 chủng vi khuẩn *E. coli*. M: thang DNA chuẩn, (-) mẫu đối chứng âm, 1-25 tương ứng với 25 mẫu vi khuẩn ký hiệu E1-E25.

Như vậy bằng phản ứng PCR, với DNA của 25 chủng vi khuẩn *E. coli* nghiên cứu và cặp mồi SK1/SK2 đã phát hiện được 13 trên tổng số 25 mẫu vi khuẩn *E. coli* dương tính với gen *eae*, chiếm tỷ lệ 52%. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Svenungsson và cs (2000) khi nghiên cứu tiêu chảy do vi khuẩn *E. coli* ở người trưởng thành cũng cho kết quả tỷ lệ phát hiện gen *eae* là 56% [8]. Sehand và Layla (2010) với tỷ lệ phát hiện gen *eae* 63,1% trong mẫu phân tiêu chảy [9]. Kết quả tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* mang gen *eae* của chúng tôi cao hơn so với một số tác giả đã công bố trước đó. Năm 2003, Nguyễn Vũ Trung và cs đã dùng kỹ thuật Multiplex PCR phát hiện tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* mang gen *eae* ở trẻ em tiêu chảy tại Hà Nội chỉ là 3% [3]. Cũng dùng phương pháp Multiplex PCR, Bii và cs (2005) đã phát hiện gen *eae* trong vi khuẩn *E. coli* gây tiêu chảy với tỷ lệ là 7% [10]. Hoàng Thị Bích Ngọc (2017) phát hiện gen *eae* trên *E. coli* gây tiêu chảy tại Hà Nội là 4,2% [11]. Như vậy, có thể thấy sự khác nhau về tỷ lệ mang gen *eae* của vi khuẩn *E. coli* giữa các nghiên cứu của các tác giả tại Việt Nam và trên thế giới. Sự khác nhau này có thể đến từ nhiều nguyên nhân như: đối tượng nghiên cứu của mỗi nhóm nghiên cứu thuộc các vùng dịch tễ khác nhau, hay sự khác nhau ở các nhóm tuổi nghiên cứu. Ngoài ra trong nghiên cứu của chúng tôi, với số lượng chỉ 25 mẫu nên không đủ để đại diện cho tỷ lệ mang gen này của vi khuẩn *E. coli* trong phân của bệnh nhân tiêu chảy tại Việt Nam.

Phát hiện gen *eae* của các chủng *E. coli* bằng kỹ thuật LAMP

Phản ứng LAMP được thực hiện với các cặp mồi được thiết kế trên trình tự gen *eae*. Lựa chọn ngẫu nhiên 5 mẫu dương tính và 1 mẫu âm tính với phản ứng PCR, 2 mẫu YTN1, YTN2 là các chủng vi khuẩn *E. coli* không gây bệnh được cung cấp bởi Trường Đại học Y dược Thái Nguyên làm đối chứng, với các thành phần phản ứng và chu kỳ nhiệt như mô tả ở trên. Sản phẩm phản ứng được phân tích trên gel agarose 2% cho kết quả được trình bày ở hình 3.



Hình 3. Sản phẩm khuếch đại gen *eae* bằng PCR (A) và LAMP (B). M: thang DNA chuẩn; (-): đối chứng âm; E1, E2, E10, E11, E20 và E4: chủng vi khuẩn kiểm tra; YTN1, YTN2: chủng đối chứng không gây bệnh.

Từ kết quả trên cho thấy: các chủng E1, E2, E10, E11 và E20 cho kết quả dương tính với phương pháp PCR (876 bp) trên hình 3A và LAMP (228 bp) trên hình 3B. Hình ảnh trên băng điện di hoàn toàn giống với mô tả của Notomi và cs (2000) [6]. Sản phẩm phản ứng LAMP xuất hiện các băng dạng bậc thang bắt đầu từ băng cơ sở có kích thước là 228 bp do sản phẩm DNA được khuếch đại với nhiều kích thước khác nhau. Ở giếng 2 là mẫu đối chứng âm không bổ sung DNA, 3 giếng cuối là chủng E4, YTN1 và YTN2 đều cho kết quả âm tính, không xuất hiện dải băng trên gel agarose sau điện di chứng tỏ bộ mồi LAMP là hoàn toàn đặc hiệu để phát hiện ra các chủng *E. coli* mang gen độc tố *eae*. Thêm vào đó, phản ứng LAMP sử dụng enzym *Bst* polymerase có hoạt tính tự tách chuỗi nên có thể khuếch đại gen *eae* ở điều kiện đẳng nhiệt khác với phương pháp PCR cần một chu trình biến thiên nhiệt nên sẽ mở ra hướng ứng dụng rộng hơn so với phương pháp PCR.

Giới hạn phát hiện gen *eae* của phản ứng LAMP

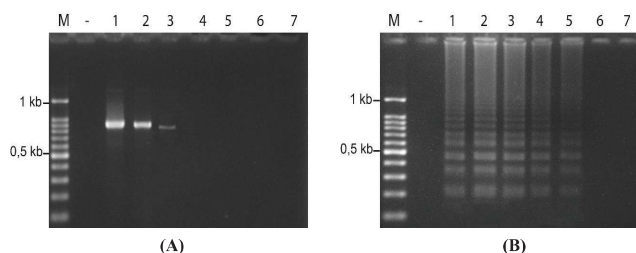
LAMP được đề cập là một phương pháp cực nhạy, giới hạn phát hiện của phản ứng LAMP ở ngưỡng picogram (pg) hoặc femtogram (fg). Trong nghiên cứu này, để xác định giới hạn phát hiện của phản ứng LAMP trong việc khuếch đại gen *eae* của vi khuẩn *E. coli*, DNA genome được pha loãng theo cơ số 10 với các nồng độ 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ... Nồng độ DNA genome ban đầu được xác định thông qua đo bằng máy nanodrop là 15 ng/μl. Các thí nghiệm được tiến hành với DNA khuôn ban đầu là 15 ng/μl, sau đó giảm dần nồng độ theo cấp số 10 từ 15 ng/μl đến 15 fg/μl. Tiến hành song song với phương pháp PCR để so sánh độ nhạy của 2 phương pháp trong cùng một nồng độ DNA. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Giới hạn phát hiện của PCR và LAMP.

Phương pháp	Hàm lượng ADN					
	15 ng	1,5 ng	0,15 ng	15 pg	1,5 pg	0,15 pg
PCR	+	+	+	-	-	-
LAMP	+	+	+	+	+	-

(+): dương tính, (-): âm tính.

Kết quả bảng 1 cho thấy: cùng với nồng độ DNA khuôn như nhau và tiến hành so sánh độ nhạy phản ứng LAMP và PCR cùng khuếch đại gen *eae*, giới hạn phát hiện của phương pháp LAMP cao hơn rất nhiều so với phương pháp PCR. Giới hạn phát hiện gen *eae* bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi SK1/SK2 có thể phát hiện được ở mức độ pha loãng 10^{-3} , tương ứng với nồng độ DNA là 0,15 ng/μl (đường chạy số 3) nhưng vạch điện di tương đối mờ. Trong khi đó, nếu sử dụng phương pháp LAMP có thể phát hiện được ở độ pha loãng rất cao (10^{-5}), tương ứng với 1,5 pg/μl (đường chạy số 5), cao gấp hơn 100 lần so với phương pháp PCR (hình 4).



Hình 4. Giới hạn phát hiện (A): phản ứng PCR, (B): phản ứng LAMP. M(A): thang DNA chuẩn 1 kb; M(B): thang DNA chuẩn 100 bp; (-): đối chứng âm; 1: 15 ng/μl, 2: 1,5 ng/μl, 3: 0,15 ng/μl, 4: 15 pg/μl, 5: 1,5 pg/μl, 6: 0,15 pg/μl, 7: 15 fg/μl.

Như vậy bằng phương pháp LAMP với các cặp mồi được thiết kế đặc hiệu cho gen *eae*, chúng tôi đã phát hiện thành công gen *eae* ở nồng độ rất thấp là 1,5 pg/μl. Kết quả này tương đồng với một số nghiên cứu đã công bố của các tác giả khác khi sử dụng phương pháp LAMP để phát hiện các gen đích. Kuboki và cs (2003) khi nghiên cứu đơn bào trypanosome gây bệnh ngủ ở người và gia súc sử dụng phương pháp LAMP đã phát hiện thành công *T. brucei* PFR A ở giới hạn nồng độ 1 pg tổng DNA, trong khi giới hạn phát hiện bằng PCR là 100 pg [12]. Cũng dùng phương pháp LAMP để phát hiện nấm *Fusarium*, Niessen và Zudi công bố phát hiện được gen đích *gaoA* - gen mã hóa galactose oxidase ở nồng độ 2 pg [13]. Verma và cs (2017) phát hiện *Leishmania tropica* ở nồng độ 1 pg [14]. Năm 2010, tác giả Trần Thị Thanh Huyền đã dùng phương pháp LAMP phát hiện thành công vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh gan thận mũ trên cá Tra Việt Nam ở nồng độ 9,4 fg [15]. Engku và cs (2018) phát hiện *Vibrio cholerae* ở nồng độ 10 fg [16], thấp hơn gần 100 lần so với nghiên cứu của chúng tôi.

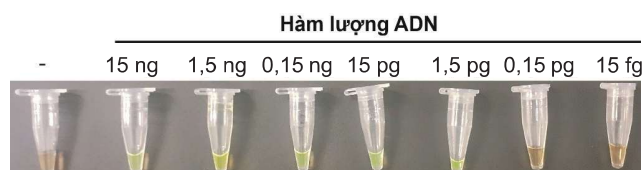
Từ nghiên cứu của chúng tôi và các công bố của các tác giả khác nhau cùng sử dụng kỹ thuật LAMP để phát hiện gen đích cho thấy, đây là phương pháp có độ nhạy cao, với giới hạn phát hiện ở mức rất thấp, phương pháp này cho độ nhạy cao gấp từ 10-100 lần so với các phương pháp PCR thông thường khi cùng phát hiện một gen đích. Do vậy, phương pháp LAMP có thể được sử dụng để phát hiện giai

đoạn sớm của bệnh, góp phần trong công tác phòng chống và điều trị tích cực cho bệnh nhân.

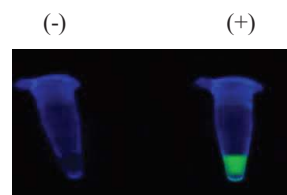
Phát hiện gen *eae* của phản ứng LAMP sử dụng chỉ thị calcein

Do hiệu quả khuếch đại DNA đích của phản ứng LAMP rất cao, dẫn đến việc rất dễ lấy nhiễm DNA trong phòng thí nghiệm, do đó chúng tôi thiết kế một hệ thống phản ứng kín trong đó toàn bộ phản ứng diễn ra trong 1 tube, kết quả của phản ứng được quan sát bằng mắt thường mà không phải điện di trên gel agarose như phương pháp PCR.

Ban đầu, mỗi ống phản ứng LAMP được bổ sung 1 μl calcein 1M, sau đó chạy phản ứng LAMP theo chu trình đẳng nhiệt ở 60°C trong vòng 60 phút. Kết quả phản ứng được quan sát dưới ánh sáng thường (hình 5) hoặc soi dưới đèn UV (hình 6).



Hình 5. Kết quả phát hiện sản phẩm phản ứng LAMP bằng chỉ thị màu calcein dưới ánh sáng thường. (-): mẫu đối chứng âm, nồng độ DNA giảm từ 15 ng đến 15 fg.



Hình 6. Kết quả phát hiện sản phẩm phản ứng LAMP bằng chỉ thị calcein dưới ánh sáng UV. (-): phản ứng âm tính, (+): phản ứng dương tính.

Khi thêm calcein vào các ống phản ứng, dưới ánh sáng thường những mẫu dương tính dung dịch sau phản ứng sẽ phát quang và chuyển sang màu xanh lá cây, những mẫu âm tính dung dịch sau phản ứng không phát quang và vẫn có màu vàng cam. Dưới ánh sáng UV, những mẫu dương tính dung dịch sau phản ứng có màu xanh lá cây rất sáng, mẫu âm tính không phát sáng và có màu đen. Kết quả thay đổi màu sắc thấy rõ ở các nồng độ DNA pha loãng giảm dần từ 15 ng đến 1,5 pg. Kết quả này hoàn toàn trùng khớp với kết quả phát hiện sản phẩm LAMP bằng điện di trên gel agarose 2% (hình 3B).

Kết luận

Bằng kỹ thuật PCR chúng tôi đã phát hiện được 13/25 mẫu vi khuẩn *E. coli* mang gen *eae* gây tiêu chảy ở người.

Tuy nhiên, để xác định sự có mặt của gen *eae*, phương pháp LAMP tỏ ra ưu việt hơn PCR ở tính đặc hiệu khi sử dụng 4 cặp mồi nhận biết 6 trình tự trên gen *eae* và có độ nhạy cao hơn 100 lần so với phương pháp PCR. Sử dụng phản ứng PCR có thể phát hiện được DNA khuôn ở nồng độ 0,15 ng/ μ l, trong khi đó bằng phản ứng LAMP có thể phát hiện sự có mặt của gen *eae* ở nồng độ rất thấp là 1,5 pg/ μ l. Calcein là chỉ thị kim loại được thêm vào từ đầu phản ứng, giúp cho việc đọc kết quả phản ứng LAMP bằng mắt thường mà không cần điện di như PCR, các phản ứng dương tính dung dịch phản ứng sẽ chuyển sang màu xanh, trong khi phản ứng âm tính có màu cam. Do đó, có thể ứng dụng phương pháp này để xác định tác nhân gây bệnh là vi khuẩn *E. coli* một cách nhanh chóng và hiệu quả, sản phẩm của phản ứng có thể được phát hiện bằng mắt thường dưới sự có mặt của một loại chỉ thị kim loại là calcein mà không cần phải điện di trên agarose.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được thực hiện bằng kinh phí từ đề tài mã số TN.18.14 của Trường Đại học Khoa học Tự nhiên và có sử dụng một số trang thiết bị của Phòng thí nghiệm thuộc Bộ môn Vi sinh vật học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bộ Y tế (2009), *Quyết định số 4121/QĐ-BYT ngày 28/10/2009, ban hành kèm theo Tài liệu hướng dẫn xử trí tiêu chảy ở trẻ em*.
- [2] <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>.
- [3] Nguyễn Vũ Trung, Lê Huy Chính, Lê Văn Phụng, Andrej Weintraub (2003), “Phát triển và ứng dụng kỹ thuật PCR đa mồi trong chẩn đoán *E. coli* gây tiêu chảy từ phân”, *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, **23(3)**, tr.7-14.
- [4] A. Konaté, R. Dembélé, A. Kagambèga, I. Soulama, W.A.D. Kaboré, E. Sampo, H. Cissé, A. Sanou, S. Serme, C. Zongo, A.M. Fody, N.K. Guessennd, A.S. Traoré, A. Gassama-Sow, N. Barro (2017), “Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia Coli* in children less than 5 years of age with diarrhea in Ouagadougou, Burkina Faso”, *Eur. J. Microbiol. Immunol.*, **7(3)**, pp.220-228.
- [5] Z. Xue-han, Y. Qing, L. Ya-dong, L. Bin, I. Renata, H. Kong-wang (2013), “Development of a LAMP assay for rapid detection of different intimin variants of attaching and effacing microbial pathogens”, *J. Med. Microbiol.*, **62(11)**, pp.1665-1672.

- [6] T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, T. Hase (2000), “Loop-mediated isothermal amplification of DNA”, *Acid Nucleic Res.*, **28(12)**, E63.
- [7] N. Tomita, Y. Mori, H. Kanda, T. Notomi (2008), “Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products”, *Nat. Protoc.*, **3(5)**, pp.877-882.
- [8] B. Svenungsson, A. Lagergren, E. Ekwall, B. Evengard, K.O. Hedlund, A. Karnell, S. Lofdahl, L. Svensson, A. Weintraub (2000), “Enteropathogens in adult patients with diarrhea and healthy control subjects: a 1-year pro-spective study in a Swedish clinic for infectious diseases”, *Clin. Infect. Dis.*, **30**, pp.770-778.
- [9] K.A. Sehand, I.F.S. Layla (2010), “Identification of different categories of diarrheagenic *Escherichia coli* in stool samples by using Multiplex PCR Technique”, *Asian Journal of Medical Sciences*, **2(5)**, pp.237-243.
- [10] C.C. Bii, H. Taguchi, T.T. Ouko, W. Muita, N. Wamae, S. Kamiya (2005), “Detection of virulence-related genes by Multiplex PCR in multidrug-resistant diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolates from Kenya and Japan”, *Epidemiol. Infect.*, **133(4)**, pp.627-633.
- [11] Hoàng Thị Bích Ngọc (2017), *Xác định sự phân bố và một số đặc điểm sinh học phân tử của nhóm *Escherichia coli* gây tiêu chảy ở trẻ em dưới 5 tuổi tại địa bàn Hà Nội*, Luận án tiến sĩ y học, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.
- [12] N. Kuboki, N. Inoue, T. Sakurai, Di Cello, F. Grab, D.J. Suzuki, C.I. Igarashi (2003), “Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes”, *J. Clin. Microbiology*, **41**, pp.5517-5524.
- [13] L. Niessen and F.V. Zudi (2010), “Detection of *Fusarium graminearum* DNA using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay”, *International Journal of Food Microbiology*, **140**, pp.183-191.
- [14] S. Verma, R. Singh, V. Sharma, R.A. Bumb, N.S. Negi, V. Ramesh, P. Salotra (2017), “Development of a rapid loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis and assessment of cure of *Leishmania* infection”, *BMC Infect Dis.*, **17(1)**, pp.223-235.
- [15] Trần Thị Thanh Huyền (2010), *Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) để xác định vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan thận mù trên cá tra*, Luận án tiến sĩ khoa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.
- [16] N.S. Engku, N.A.B. Nurul, P.C. Foo, M.R. Mohd Ali, M. Mohamed, C.Y. Yean (2018), “An ambient temperature stable and ready-to-use loop-mediated isothermal amplification assay for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* in outbreak settings”, *Acta Trop.*, **182**, pp.223-231.