

Khảo sát điều kiện phản ứng polymerase spiral reaction trong việc phát hiện nhanh gen kháng methicillin của *Staphylococcus aureus*

Vũ Quang Hiếu^{1,*}, Trần Thị Quỳnh Như²

¹Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT, Đại học Nguyễn Tất Thành

²Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm, Tp. Hồ Chí Minh

*vqhieus@ntt.edu

Tóm tắt

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) là một trong những vi khuẩn gây bệnh nguy hiểm cho người và vật nuôi, đặc biệt là khi chúng kháng lại kháng sinh methicillin. Do đó, việc phát hiện các dòng *S. aureus* kháng kháng sinh methicillin (MRSA) rất quan trọng trong việc lựa chọn kháng sinh phù hợp để điều trị. Trong đó, trình tự gen *mecA* quy định một trong những tổ hợp kháng methicillin của MRSA được sử dụng làm dấu ấn sinh học cho các kỹ thuật sinh học phân tử. Nghiên cứu dựa trên phản ứng trùng hợp vòng xoắn - Polymerase spiral reaction (PSR) với mục đích khuếch đại đoạn gen *mecA* trong điều kiện đẳng nhiệt và không yêu cầu trang thiết bị đắt tiền. Do vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là khảo sát điều kiện phản ứng PSR nhằm phát hiện nhanh gen *mecA* trên MRSA. Kết quả đã xác định được điều kiện tối ưu của phản ứng PSR là nhiệt độ 65 °C trong 50 phút, với nồng độ tối ưu của mỗi F1+Nr/R1+N là 1,6 μM và nồng độ tối ưu của mỗi F2/R2 là 0,1 μM. Trong đó, giới hạn phát hiện của phản ứng PSR đối với DNA tách chiết là 10⁻³ ng/μL và đối với tế bào vi khuẩn là 5 tế bào/μL.

Nhận 14.05.2021

Được duyệt 21.06.2021

Công bố 15.07.2021

Từ khóa

Staphylococcus aureus, MRSA, Polymerase Spiral Reaction, gen *mecA*.

© 2021 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

MRSA (*Staphylococcus aureus* kháng methicillin) là một tác nhân gây bệnh nhiễm trùng hàng đầu trên người [1]. Trước đây, kháng sinh methicillin được sử dụng rộng rãi trong điều trị *S. aureus*. Tuy nhiên đến năm 1961, chủng MRSA đầu tiên mới được phân lập [2]. Trong một khảo sát tại Mỹ từ 6.2004 đến 12.2005 cho thấy đã có 18 650 người chết vì nhiễm trùng MRSA [3]. Còn tại châu Âu, ước tính có khoảng 170 000 ca nhiễm MRSA hàng năm, gây ra hơn 5 000 ca tử vong [4]. Do đó, việc chẩn đoán các chủng MRSA ở bệnh nhân được xem như là một tiêu chuẩn xét nghiệm, cũng như là một tiêu chí quan trọng trong điều trị bệnh nhiễm trùng.

Đến nay, rất nhiều các nghiên cứu phát hiện MRSA bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử thông qua việc phát hiện gen *mecA*, trong đó kỹ thuật PCR

được xem là “tiêu chuẩn vàng” [5]. Tuy nhiên, kỹ thuật PCR đòi hỏi cơ sở xét nghiệm phải có đầy đủ trang thiết bị bao gồm máy luân nhiệt, bồn điện di và máy đọc gel. Gần đây, một phương pháp phân tử mới là phản ứng trùng hợp vòng xoắn (Polymerase Spiral Reaction - PSR) cho phép khuếch đại đoạn gen đích ở điều kiện đẳng nhiệt đã đáp ứng được các yêu cầu về độ nhanh, độ đặc hiệu và độ nhạy cao [6]. Nhờ những ưu điểm nổi bật này mà phương pháp PSR ngày càng được nghiên cứu sâu rộng nhằm áp dụng trong việc phát hiện nhanh các tác nhân gây bệnh.

Cho đến nay, chưa thấy nghiên cứu nào sử dụng phương pháp PSR để phát hiện gen *mecA* của MRSA. Do vậy, nghiên cứu này thử nghiệm ứng dụng phương pháp PSR nhằm xây dựng quy trình phát hiện nhanh MRSA.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu



2.1 Vật liệu

S. aureus (ATCC 33592) mang gen *mecA* (MRSA) làm đối chứng dương, *S. aureus* (ATCC 29213) được làm đối chứng âm, cùng một số chủng *S. aureus* khác được cung cấp bởi Phòng Vi sinh, Viện Kỹ thuật Công nghệ cao Nguyễn Tất Thành.

Một số hóa chất sinh học phân tử bao gồm 2X WarmStart Colorimetric LAMP Master Mix (New England Biolabs (NEB), Anh), PCR kit (NEB, Anh). Agarose gel (Bioline, Anh), nước khử ion. Các môi thiết kế được đặt tổng hợp tại Công ty Phù Sa, Việt Nam. Hóa chất dùng nuôi cấy vi sinh gồm TSB - Tryptic Soy Broth (Merch, Đức), TSA - Tryptic Soy Agar (Merch, Đức), NaCl (Biopharmaceuticals & Titrimetry), Agar.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế môi

Bộ môi cho phản ứng PSR được thiết kế trên vùng gen *mecA* của MRSA với số hiệu là NG_047937.1 từ ngân hàng dữ liệu gene NCBI. Các cặp môi được thiết kế theo hướng dẫn trên website Primer Explorer v.5 (<https://primerexplorer.jp/e/>), với đoạn N và Nr được thiết kế dựa trên nghiên cứu của Liu và cộng sự (2015), chỉ thay đổi một vài nucleotide và chèn thêm trình tự enzyme cắt *Bam*HI [6]. Sau thiết kế, các cặp môi được kiểm tra độ đặc hiệu bằng chương trình Primer Blast trên NCBI.

2.2.2. Tách chiết DNA

DNA vi khuẩn được tách chiết theo phương pháp CTAB của Minas và cộng sự (2011) [7]. Độ tinh sạch và hàm lượng DNA tổng số sau tách chiết được kiểm tra bằng việc đo chỉ số OD ở hai điểm có bước sóng 260 nm và 280 nm bằng máy đo OD (Jenway – Anh). Tỉ số OD_{260/280} nằm trong khoảng 1,8 - 2,2 thì chứng tỏ DNA sạch và đủ tiêu chuẩn để làm vật liệu cho các phản ứng PCR, PSR.

2.2.3. PCR khuếch đại gen *mecA*

Một phản ứng PCR bao gồm mỗi loại môi là 0,4 μ L (10 μ M); dNTPs 0,4 μ L (10 mM); enzyme *Taq* DNA polymerase 0,1 μ L; OneTaq Standard Reaction Buffer (5X) 4 μ L; DNA mẫu (50 ng/ μ L) 2 μ L và nước khử ion cho tổng thể tích cuối cùng của 1 phản ứng là 20 μ L. Phản ứng sau đó chạy với chu trình nhiệt: tiền biến tính ở 95 °C trong 5 phút; 40 chu kỳ với biến tính ở 95 °C trong 15 giây, bắt cặp ở 53,7 °C trong 15 giây và kéo dài ở 68 °C trong 15 giây; cuối cùng là bước hậu kéo dài ở 72 °C trong 5 phút bằng máy PCR

(Cole-Parmer Ltd – UK). Quan sát kết quả PCR thông qua điện di trên gel agarose 1,5 % pha trong đệm TBE 1X, chạy ở điện thế 75 V, trong 75 phút và được nhận biết bằng thuốc nhuộm GelRed. Kết quả được đọc bằng hệ thống chụp ảnh gel (Clever Scientific - Anh). Sản phẩm PCR được giải trình tự tại công ty VNDAT và kết quả giải trình tự được phân tích nhờ các phần mềm Bioedit, Seaview và Blast.

2.2.4. Thiết lập phản ứng PSR

Nồng độ các thành phần trong phản ứng dựa theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Phản ứng PSR được thực hiện với tổng thể tích của 1 phản ứng là 15 μ L theo tỉ lệ các thành phần như sau: 2,4 μ L mỗi loại môi F1+Nr/R1+N (10 μ M); 0,3 μ L mỗi loại môi F2/R2 (10 μ M); 7,5 μ L LAMP master mix; 1 μ L DNA mẫu (6 ng/ μ L) và bổ sung nước khử ion sao cho thể tích cuối cùng là 15 μ L. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong máy ủ nhiệt khô ở nhiệt độ 65 °C trong 60 phút. Kết quả được đánh giá thông qua sự thay đổi màu sắc của các ống mẫu dương và mẫu âm sau phản ứng, đồng thời quan sát nhờ điện di trên gel agarose 1,5 % ở điện thế 60 V trong 60 phút.

2.2.5. Tối ưu hóa phản ứng PSR

Các thông số cần được tối ưu trong phản ứng PSR gồm nhiệt độ, thời gian và nồng độ môi.

2.2.5.1 Khảo sát nhiệt độ tối ưu

Hỗn hợp phản ứng được trộn đều với nhau và phân thành 14 nhóm ống, trong đó nồng độ, thể tích các thành phần và các điều kiện khác không thay đổi, chỉ thay đổi nhiệt độ phản ứng. Thiết lập chương trình gradient nhiệt độ (các mức nhiệt độ từ (55 – 68) °C với mỗi mức cách nhau 1 °C) tại máy PCR và đặt các ống phản ứng vào các mức nhiệt độ tương ứng. Các yếu tố thời gian là 50 phút, nồng độ môi 2,4 μ L mỗi loại môi F1+Nr/R1+N (10 μ M); 0,3 μ L mỗi loại môi F2/R2 (10 μ M); lượng DNA phản ứng (6 ng/ μ L) được giữ yên.

2.2.5.2 Khảo sát thời gian tối ưu

Tương tự như trên, hỗn hợp phản ứng với nồng độ và thể tích các thành phần đồng nhất và giữ nguyên các điều kiện khác, chỉ thay đổi thời gian phản ứng. Thời gian tối ưu của phản ứng được khảo sát từ (30 – 65) phút, mỗi khoảng cách nhau 5 phút với điều kiện nhiệt độ đã được tối ưu. Các yếu tố nhiệt độ là 65 °C, nồng độ môi 2,4 μ L mỗi loại môi F1+Nr/R1+N (10 μ M);

0,3 μL mỗi loại môi F2/R2 (10 μM); lượng DNA phản ứng (6 ng/ μL) được giữ yên.

2.2.5.3 Khảo sát nồng độ môi tối ưu

Cặp môi F1+Nr/R1+N được khảo sát trong khoảng nồng độ là 0,4 μM - 3,2 μM , cặp môi F2/R2 được khảo sát trong khoảng nồng độ là 0,05 μM - 0,4 μM . Nồng độ các môi trong hỗn hợp thay đổi tương ứng với các nồng độ ở các nghiệm thức trong Bảng 1. Đồng thời, các điều kiện và nồng độ các thành phần còn lại của phản ứng không thay đổi, tiến hành ủ phản ứng ở nhiệt độ và thời gian đã được tối ưu. Các yếu tố thời gian là 50 phút, nhiệt độ 65 $^{\circ}\text{C}$ lượng DNA phản ứng (6 ng/ μL) được giữ nguyên.

Bảng 1 Các nghiệm thức khảo sát môi

| F2/R2 (μM) | F1+Nr/R1+N (μM) | | | | |
|----------------------------|------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 2,4 | 3,2 |
| 0,05 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 0,1 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 0,2 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| 0,3 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| 0,4 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 |

Trong đó, các số 1 - 25 là các nghiệm thức khảo sát ở các nồng độ môi tương ứng.

2.2.6. Khảo sát giới hạn phát hiện của phản ứng PSR

Giới hạn phát hiện (LOD) của phản ứng PSR được xác định trên dãy nồng độ mẫu đưa vào bao gồm lượng DNA tách chiết và mật độ tế bào. Các LOD được ghi nhận khi phản ứng có sự thay đổi màu pH tại nồng độ mẫu thấp nhất.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Kết quả

3.1.1. Thiết kế môi

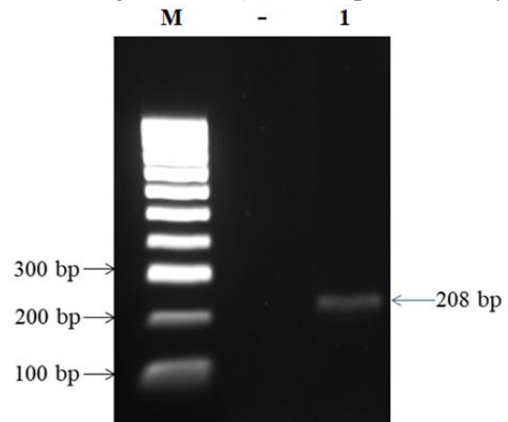
Môi được thiết kế bằng website Primer Explorer v.5 trên trình tự gen *mecA* của MRSA, kết quả chọn được hai cặp môi có các thông số kỹ thuật tốt nhất, trình tự các môi được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2 Trình tự các cặp môi của phản ứng PSR

| Tên môi | Độ dài (bp) | Trình tự (5'-3') |
|---------|-------------|---|
| F2 | 21 | GCGACTTCACATCTATTAGGT |
| R2 | 22 | GCCATCTTTTTCTTTTTCTCT |
| F1+Nr | 42 | gattcgtacatagaaggatccTATGTTGGT CCCATTA ACTCT |
| R1+N | 45 | cctaggaagatacatgcttagCGATTGTAT TGCTATTATCGTCAA |

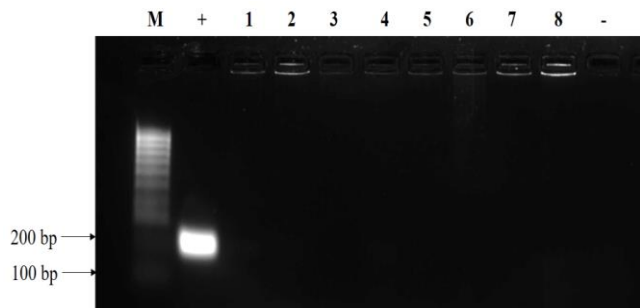
3.1.2. PCR khuếch đại gen *mecA*

Mẫu chuẩn MRSA ATCC 33592 được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp môi F1+Nr/R1+N. Kết quả điện di sản phẩm PCR ở Hình 1 cho thấy ở giếng số 1 xuất hiện băng có kích thước sản phẩm gần với vạch 200 bp theo Ladder 100 bp, ước đoán băng có kích thước khoảng 208 bp. Điều đó cho thấy cặp môi F1+Nr/R1+N sử dụng để khuếch đại gen *mecA* đã nhân thành công đoạn gen có kích thước tương đương với kích thước gen *mecA* (dài 208 bp theo lý thuyết).



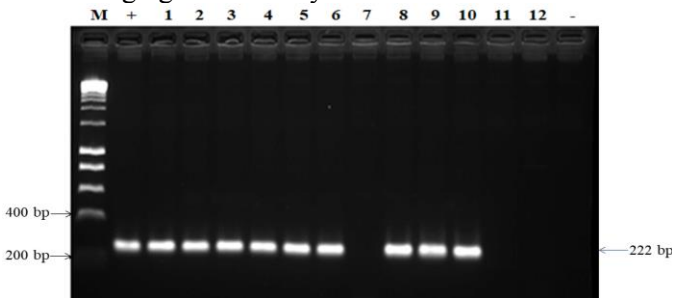
Hình 1 Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp môi F1+Nr/R1+N. (M) Ladder 100 bp; (-) đối chứng âm; (1) ATCC 33592

Kết quả trên được đem đi giải trình tự sản phẩm PCR với cặp môi F1+Nr/R1+N của mẫu ATCC 33592 cho kích thước đoạn gen là 166 bp. Hình ảnh phổ đọc kết quả giải trình tự trên phần mềm Bioedit cho thấy các peak không bị xếp chồng lên nhau, chỉ trừ một số nucleotide ở hai đầu. Điều này cho thấy tín hiệu không bị nhiễu, kết quả giải trình tự tốt. Các trình tự được sắp giống cột thẳng hàng trên SeaView cho thấy kết quả giải trình tự hoàn toàn trùng khớp với trình tự gen *mecA* trên NCBI được dùng để thiết kế môi. Trình tự sau khi hiệu chỉnh được so sánh với các trình tự trên GenBank bằng chương trình Blast cho thấy kết quả giải trình tự có độ tương đồng 100 % với trình tự gen *mecA* của *S. aureus*, chứng tỏ trình tự sản phẩm PCR của mẫu ATCC 33592 chính là trình tự gen *mecA*. Như vậy, có thể khẳng định rằng cặp môi F1+Nr/R1+N đã khuếch đại thành công gen *mecA* trên *S. aureus*. Đồng thời độ đặc hiệu của cặp môi thiết kế cũng được kiểm tra chéo với các chủng vi khuẩn khác bao gồm *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp... Kết quả cho thấy mỗi các đoạn môi thiết kế bắt cặp đặc hiệu và chỉ khuếch đại gen *mecA* trên MRSA (Hình 2).



Hình 2 Kết quả kiểm tra độ đặc hiệu của cặp mồi F1+Nr/R1+N. (M) Ladder 100 bp, (+) ATCC 33592, (1) *Streptococcus pyogenes*, (2) *Salmonella* sp, (3) *Pseudomonas aeruginosa*, (4) *Vibrio parahaemolyticus*, (5) *Bacillus subtilis*, (6) *Vibrio cholera*, (7) *Enterococcus faecalis*, (8) *Escherichia coli*, (-) đối chứng âm.

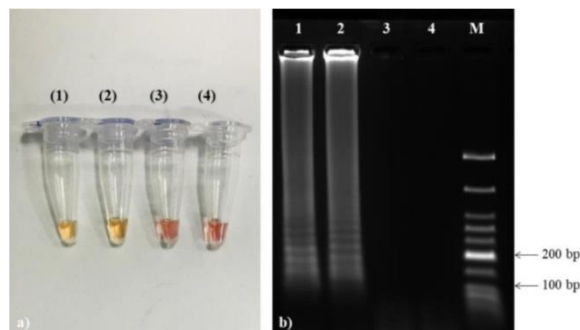
Phản ứng PCR với cặp mồi F2/R2 được thực hiện nhằm mục tiêu kiểm tra khả năng phát hiện gen *mecA* của mồi F2/R2. Thí nghiệm được tiến hành đồng loạt với 12 mẫu DNA tách chiết từ các chủng *S. aureus*, cùng với một đối chứng dương là mẫu DNA có mang gen *mecA* (ATCC 33592) và một đối chứng âm là nước khử ion. Kết quả điện di sản phẩm PCR ở Hình 3 cho thấy tại giếng của đối chứng dương xuất hiện một dải sáng có kích thước tương đương với kích thước dự đoán (khoảng 222 bp). Đồng thời, ở các giếng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 và 10 có xuất hiện dải sáng, rõ và bằng với kích thước của đối chứng dương. Điều đó chứng tỏ rằng 9 mẫu này có chứa trình tự gen *mecA*. Ở các giếng 7, 11, 12 và đối chứng âm không xuất hiện dải, chứng tỏ các mẫu này không chứa trình tự gen *mecA*. Kết quả thu được được hoàn toàn phù hợp với kết quả kiểm tra sinh hóa của các dòng *S. aureus* trước đó. Do đó, thí nghiệm đã chứng minh rằng cặp mồi F2/R2 có thể phát hiện thành công gen *mecA* trong nghiên cứu này.



Hình 3 Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi F2/R2. (M) Ladder 1 kb; (+) đối chứng dương; (1) 07088; (2) 07088 VR1; (3) 07088 VR2; (4) 06949; (5) 06292; (6) 42335; (7) 50426; (8) 90217; (9) 80274; (10) 57218; (11) 04772; (12) ATCC 29213; (-) đối chứng âm.

3.1.3. Thiết lập phản ứng PSR

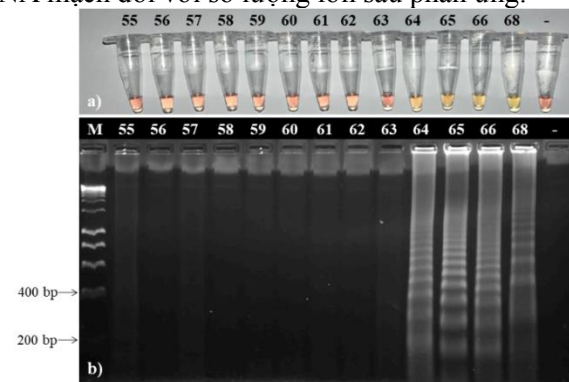
Phản ứng PSR được thiết lập để kiểm tra môi và các thành phần phản ứng. Phản ứng được thực hiện ở 65 °C trong 60 phút. Kết quả Hình 4a cho thấy có sự thay đổi màu ở ống số 1 và 2, ứng với 2 mẫu dương tính là ATCC 33592 và ATCC 06292. Mẫu âm tính là ATCC 29213 và đối chứng âm ở ống số 3, 4 vẫn giữ nguyên màu hồng. Đồng thời, kết quả điện di ở Hình 4b cho thấy giếng số 1, 2 xuất hiện một vệt bôi với các dải có kích thước khác nhau. Quan sát giếng số 3, 4 thì không xuất hiện dải. Từ các kết quả trên, chúng tôi rằng phản ứng PSR đã được thực hiện thành công.



Hình 4 Kết quả kiểm tra các thành phần phản ứng PSR. a) Quan sát bằng mắt thường, b) Quan sát bằng điện di trên gel agarose. Trong đó: (1) ATCC 33592; (2) 06292; (3) ATCC 29213; (4) đối chứng âm; (M) Ladder 25 bp.

3.1.4. Tối ưu hóa phản ứng PSR

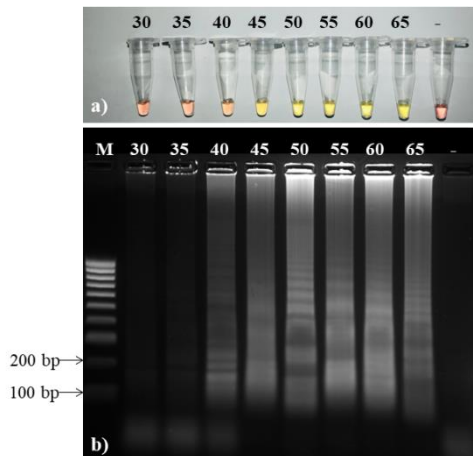
Nhiệt độ phản ứng PSR được khảo sát trong khoảng nhiệt độ (55 - 68) °C, mỗi khoảng cách nhau 1 °C. Hỗn hợp phản ứng được đặt trong máy PCR (Cole-Parmer Ltd – UK) đã được thiết lập mức nhiệt độ tương ứng và ủ trong thời gian 60 phút. Kết quả khi quan sát trực tiếp bằng mắt thường cho thấy khoảng nhiệt độ (64 - 68) °C có sự thay đổi màu sắc so với đối chứng âm, màu phản ứng chuyển từ màu hồng sang màu vàng (Hình 5a), chứng tỏ có sự hiện diện của DNA mạch đôi với số lượng lớn sau phản ứng.



Hình 5 Kết quả khảo sát nhiệt độ phản ứng PSR a) Quan sát bằng mắt thường, b) Quan sát dưới ánh sáng xanh có bổ sung SYBR Green, c) Quan sát bằng điện di trên gel agarose. Trong đó: (M) Ladder 1 kb; (55 - 68) sản phẩm PSR lần lượt ở các nhiệt độ (55 - 68) °C; (-) đối chứng âm.

Kết quả điện di trên gel agarose 1,5 % ở Hình 5b cũng cho kết quả tương tự, chứng tỏ rằng trong khoảng nhiệt độ (64 - 68) °C phản ứng có xảy ra sự khuếch đại gen mục tiêu. Đặc biệt, tại nhiệt độ 65 °C cho dải sáng và rõ nhất, cho thấy ở nhiệt độ này sự khuếch đại đạt hiệu suất cao nhất.

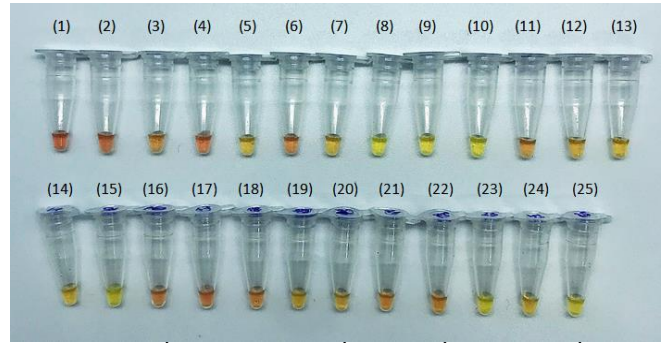
Thời gian phản ứng PSR được khảo sát trong khoảng (30 - 65) phút, mỗi khoảng cách nhau 5 phút. Hỗn hợp phản ứng được đặt trong máy ủ nhiệt ở nhiệt độ 65 °C. Khi quan sát bằng mắt thường có thể thấy có sự thay đổi màu sắc rõ ràng từ 45 phút trở đi (Hình 6a). Quan sát kết quả điện di sản phẩm PSR ở Hình 6b, cho thấy sau 30 phút, 35 phút thì chỉ xuất hiện vệt mờ, chứng tỏ phản ứng xảy ra chưa hoàn toàn nên số lượng sản phẩm khuếch đại còn ít. Từ (40 - 65) phút thì xuất hiện vệt bôi với các dải sáng và rõ. Đặc biệt, kết quả điện di sau 50 phút cho kết quả dải điện di rõ ràng, cho thấy 50 phút là thời gian ngắn nhất mà sự khuếch đại đạt hiệu suất cao.



Hình 6 Kết quả khảo sát thời gian phản ứng PSR

a) Quan sát bằng mắt thường, b) Quan sát bằng điện di trên gel agarose. Trong đó: (M) Ladder 100 bp; (30 - 65) sản phẩm PSR lần lượt sau (30 - 65) phút; (-) đối chứng âm.

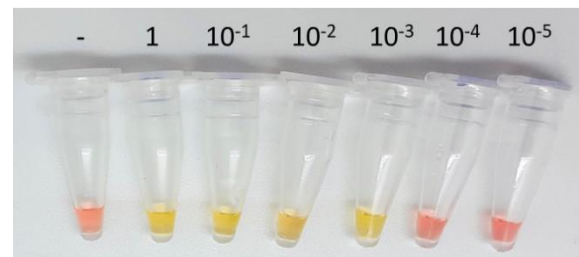
Cặp môi F1+Nr/R1+N được khảo sát trong khoảng nồng độ (0,4 - 3,2) μM , cặp môi F2/R2 khảo sát trong khoảng nồng độ (0,05 - 0,4) μM . Phản ứng ở nhiệt độ 65 °C trong 50 phút. Từ kết quả ở Hình 7, trong 25 nghiệm thức cho kết quả màu phản ứng ở nghiệm thức 8 tương ứng với nồng độ môi F2/R2 là 0,1 μM và nồng độ môi F1+Nr/R1+N là 1,6 μM có sự thay đổi màu sắc rõ ràng nhất, chứng tỏ phản ứng khuếch đại đạt hiệu quả nhất. Vì vậy, môi F2/R2 có nồng độ là 0,1 μM và môi F1+Nr/R1+N có nồng độ là 1,6 μM là nồng độ môi tối ưu của phản ứng PSR.



Hình 7 Kết quả khảo sát nồng độ môi quan sát bằng mắt thường. Trong đó: (1 - 25) sản phẩm PSR tương ứng với các nghiệm thức trong Bảng 1.

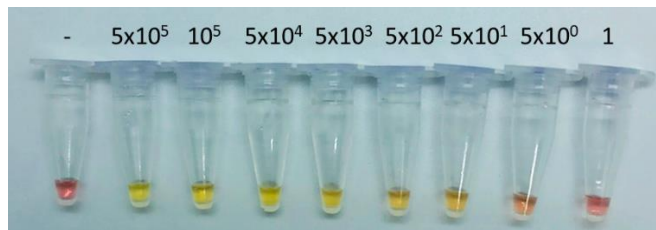
3.1.5. Giới hạn phát hiện của phản ứng PSR

Nồng độ DNA của mẫu ATCC 33592 được pha loãng theo bậc 10 liên tiếp về các nồng độ (1 - 10^{-5}) ng/ μL và dùng để khảo sát giới hạn phát hiện DNA tách chiết với các điều kiện tối ưu. Kết quả quan sát trực tiếp bằng mắt thường ở Hình 8a cho thấy sự thay đổi màu sắc diễn ra tại các nồng độ (1, 10^{-1} , 10^{-2} và 10^{-3}) ng/ μL . Tại nồng độ DNA là 10^{-4} ng/ μL , 10^{-5} ng/ μL thì màu sắc phản ứng không thay đổi, vẫn giữ nguyên màu hồng. Từ những kết quả trên, chứng tỏ rằng từ nồng độ DNA 10^{-4} trở đi không xảy ra sự khuếch đại sản phẩm. Từ đó có thể kết luận rằng nồng độ DNA 10^{-3} ng/ μL là nồng độ DNA thấp nhất có thể phát hiện được gen mục tiêu.



Hình 8 Kết quả khảo sát giới hạn phát hiện DNA tách chiết. Trong đó: (-) đối chứng âm; (1 - 10^{-5}) sản phẩm PSR tương ứng với các nồng độ DNA pha loãng là (1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} và 10^{-5}) ng/ μL .

Khảo sát giới hạn phát hiện tế bào vi khuẩn của phản ứng PSR ở các nồng độ tế bào vi khuẩn được pha loãng theo bậc 10 liên tiếp từ (5×10^5 - 1) tế bào/ μL . Kết quả quan sát trực tiếp bằng mắt thường ở Hình 9a cho thấy có sự thay đổi màu sắc phản ứng xảy ra ở nồng độ pha loãng là (5×10^5 - 5) tế bào/ μL , trong khi đó thực hiện phản ứng với 1 tế bào/ μL thì màu sắc phản ứng vẫn giữ nguyên màu hồng. Từ đó, có thể kết luận 5 tế bào/ μL là nồng độ tế bào vi khuẩn thấp nhất mà phương pháp PSR có thể phát hiện được gen *mecA*.



Hình 9 Kết quả khảo sát giới hạn phát hiện tế bào vi khuẩn. (-) đối chứng âm; ($5 \times 10^5 - 1$) sản phẩm PSR tương ứng với nồng độ tế bào vi khuẩn ($5 \times 10^5 - 1$) tế bào/ μL

3.2 Thảo luận

Đặc trưng của phương pháp PSR là khuếch đại DNA trong điều kiện đẳng nhiệt, nhiệt độ phù hợp cho phản ứng dao động từ ($50 - 70$) $^{\circ}\text{C}$. Kết quả khảo sát nhiệt độ của phản ứng PSR cho thấy ở nhiệt độ 65°C sự khuếch đại đạt hiệu suất cao nhất. Đây là nhiệt độ thích hợp để môi gắn vào mạch khuôn, đồng thời cũng là nhiệt độ mà enzyme *Bst* DNA polymerase hoạt động tốt. Trong một nghiên cứu của Ji và cộng sự (2019), nhiệt độ tối ưu cho việc khuếch đại PCV3 của phản ứng PSR là 62°C [8]. Điều này cho thấy không có sự chênh lệch quá lớn so với nhiệt độ tối ưu khuếch đại gen *mecA* trong nghiên cứu này. Phương pháp PSR khuếch đại gen mục tiêu dưới một nhiệt độ duy nhất, khác với phương pháp PCR phải trải qua các giai đoạn nhiệt độ khác nhau. Trong điều kiện cơ sở vật chất tại vùng sâu, vùng xa thì phương pháp PSR là một lựa chọn phù hợp cho việc phát hiện các tác nhân gây bệnh.

Thời gian tối ưu trong nghiên cứu này là 50 phút, đây là thời gian ngắn nhất mà sự khuếch đại vẫn đạt hiệu suất cao. Trong khi đó, thí nghiệm khuếch đại gen *mecA* bằng phương pháp PCR truyền thống mất khoảng (90 - 120) phút. Ngoài ra, thời gian tối ưu để khuếch đại gen *mecA* bằng phương pháp LAMP là 60 phút [9], [10]. Từ đó, cho thấy thời gian phát hiện gen mục tiêu của phương pháp PSR trong nghiên cứu này ngắn hơn so với các phương pháp khác.

Trong phản ứng PSR, các môi không hoạt động riêng lẻ như trong phản ứng PCR mà chúng kết hợp với nhau để bắt cặp với đoạn gen mục tiêu và khuếch đại để tạo ra các bản sao. Do đó, sự thay đổi nồng độ hay tỉ lệ của các cặp môi có ảnh hưởng đến khả năng khuếch đại sản phẩm của phản ứng. Phương pháp PSR chỉ sử dụng (2 - 4) môi, trong khi đó phương pháp LAMP phải sử dụng (4 - 6) môi nên việc thiết kế môi cho phản ứng PSR đơn giản hơn. Đồng thời, phương

pháp PSR cũng hạn chế xảy ra trường hợp primer-dimer của phản ứng LAMP.

Giới hạn phát hiện tế bào vi khuẩn của phản ứng PSR là 5 tế bào/ μL , là nồng độ tế bào vi khuẩn thấp nhất mà phản ứng PSR có thể phát hiện được gen mục tiêu. Đối với DNA tách chiết, giới hạn phát hiện của phản ứng PSR là 10^{-3} ng/ μL (ứng với 1 pg/ μL). Trong khi đó, giới hạn phát hiện của phản ứng LAMP cho gen *mecA* là 10 pg/ μL [9] và 14,7 pg/ μL [10]. Điều này cho thấy rằng phản ứng PSR có thể phát hiện được gen mục tiêu trong nghiên cứu này ở ngưỡng thấp hơn ngưỡng phát hiện của phản ứng LAMP.

Việc phát hiện gen *mecA* của *S. aureus* bằng phương pháp PSR có nhiều ưu điểm vượt trội so với phương pháp PCR và phương pháp LAMP là thời gian phát hiện ngắn, quy trình đơn giản, độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Trong điều kiện phòng xét nghiệm đơn giản, không có đầy đủ trang thiết bị thì xét nghiệm bằng phương pháp PSR có thể triển khai và kết quả là rất khả thi, bảo đảm phát hiện nhanh, chính xác MRSA để lựa chọn kháng sinh phù hợp cho việc điều trị.

4 Kết luận

Bộ môi được thiết kế hoạt động tốt, có tính đặc hiệu cao với gen *mecA* của MRSA. Kết quả nghiên cứu này đã hoàn thiện quy trình phát hiện nhanh gen *mecA* ở *S. aureus* bằng kĩ thuật PSR, với điều kiện phản ứng và nồng độ môi tối ưu tóm tắt ở Bảng 3.

Bảng 3 Nồng độ môi tối ưu của phản ứng PSR ở nhiệt độ 65°C với thời gian phản ứng 50 phút

| Nồng độ môi (μM) | F1+Nr | 1,6 |
|-------------------------------|-------|-----|
| | R1+N | 1,6 |
| | F2 | 0,1 |
| | R2 | 0,1 |

Giới hạn phát hiện của phương pháp PSR là 10^{-3} ng/ μL đối với DNA tách chiết và 5 tế bào/ μL đối với tế bào vi khuẩn.

Phương pháp PSR đáp ứng yêu cầu phát hiện nhanh và chính xác gen *mecA* ở vi khuẩn *S. aureus*, có thể được chọn làm công cụ để phát hiện các ca bệnh nhiễm trùng do MRSA.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, đề tài mã số 2020.01.72 /HD-NCKH.

Tài liệu tham khảo

1. Gardam M.A. Is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* an emerging community pathogen? A review of the literature (2000). *Can J Infect Dis*, 11(4), 202-211.
2. Jevons M.P (1961). "Celbenin" - Resistant *Staphylococci*. BMJ Publishing Group, 1, 124-125.
3. Klevens R.M, Morrison M.A, Nadle J et al (2007). Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *J Am Med Assoc*, 298(15), 1763-1771.
4. Köck R, Becker K, Cookson B et al (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Burden of disease and control challenges in Europe. *Eurosurveillance*, 15(41).
5. Pillai M.M, Latha R, Sarkar G (2012). Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction and Conventional Methods: A Comparative Study. *J Lab Physicians*, 4(02), 83-88.
6. Liu W, Dong D, Yang Z et al (2015). Polymerase Spiral Reaction (PSR): A novel isothermal nucleic acid amplification method. *Sci Rep*, 5.
7. Minas K, Mcewan N.R, Newbold C.J, Scott K.P (2011). Optimization of a high-throughput CTAB-based protocol for the extraction of qPCR-grade DNA from rumen fluid, plant and bacterial pure cultures. *FEMS Microbiol Lett*, 325(2), 162-169.
8. Ji J, Xu X, Wang X, et al (2019). Novel polymerase spiral reaction assay for the visible molecular detection of porcine circovirus type 3. *BMC Vet Res*, 15(1).
9. Nawattanapaiboon K, Prombun P, Santanirand P et al (2016). Hemoculture and Direct Sputum Detection of *mecA*-Mediated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Loop-Mediated Isothermal Amplification in Combination With a Lateral-Flow Dipstick. *J Clin Lab Anal*, 30(5), 760-767.
10. Wang X.R, Wu L.F, Wang Y, Ma Y.Y, Chen F.H, Ou H.L (2014). Rapid Detection of *Staphylococcus aureus* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Appl Biochem Biotechnol*, 175(2), 882-891.

Investigating polymerase spiral reaction conditions in the detecting of anti-methicillin resistant gene (*MecA*) of *Staphylococcus aureus*

Vu Quang Hieu^{1*}, Tran Thi Quynh Nhu²

¹Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University

²Biotechnology department, Nong Lam University, Ho Chi Minh City

*vqhieu@ntt.edu.vn

Abstract Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the most dangerous pathogens, especially sepsis. The *mecA* gene is located on a genetic factor, *SCCmec*, which is commonly used to detect MRSA by molecular biology techniques. The PSR technique (Polymerase Spiral Reaction) allows the amplification of the target gene sequence under isothermal conditions which is suitable for detection of MRSA. The results showed the optimal protocol of the PSR reaction with a temperature of 65 °C, a time of 50 minutes with the optimal primer concentration of 1,6 μM F1+Nr/R1+N; 0,1 μM F2/R2. The detection limit of extracted DNA is 10⁻³ ng/μL and the detection limit of bacterial cells is 5 bacterial cells/μL. The optimized PSR technique in this study was capable of detecting the *mecA* gene with a sensitivity and specificity of 100 %.

Keywords PSR (Polymerase Spiral Reaction), *mecA* gene.

