Phát hiện nhanh *Clostridium perfringens* bằng kĩ thuật RPA (recombinase polymerase amplification) khuếch đại acid nucleic đẳng nhiệt

Trần Hồng Diễm[2*], Lâm Ngọc Ngân Anh[1]

[1]Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia Tp.HCM
[2]Viện Kĩ thuật Công nghệ cao, Đại học Nguyễn Tất Thành
[*]thdiem@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Clostridium perfringens được xem là một trong những tác nhân gây ngộ độc thực phẩm phổ biến nhất chỉ sau *Salmonella*. *C. perfringens* là trực khuẩn yếm khí, Gram dương có nhiều trong đất, ruột động vật, có thể nhiễm vào các loại thịt, đặc biệt là thực phẩm đông lạnh, gây ngộ độc cho người với các triệu chứng đau bụng và tiêu chảy. Để phát hiện vi khuẩn gây bệnh này, các phương pháp phân lập, nuôi cấy, sinh hóa thông thường cũng như kĩ thuật PCR được thực hiện theo các quy trình phức tạp, tốn nhiều thời gian. Và cũng cần kĩ thuật viên có kinh nghiệm, máy luân nhiệt chuyên dụng đắt tiền. Nghiên cứu này ứng dụng kĩ thuật RPA (recombinase polymerase amplification) khuếch đại acid nucleic đẳng nhiệt để phát hiện nhanh Clostridium perfringens. RPA có thời gian phản ứng nhân bản DNA đích ngắn, thực hiện chỉ tại một nhiệt độ, đạt được độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Kết quả đã xác lập được một quy trình phát hiện chính xác đặc trưng của *C. perfringens* trong thời gian 25 phút tại nhiệt độ 38 ^{0}C, nhạy hơn 10 lần so với kĩ thuật PCR, tạo tiền đề cho việc phát hiện trực tiếp *C. perfringens* trên các loại mẫu thực phẩm.

Nhận 18.12.2020
Được duyệt 25.03.2021
Công bố 09.04.2021

Từ khóa
C. perfringens, RPA, đẳng nhiệt

® 2021 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Tổng quan

C. perfringen là vi khuẩn gram dương, hình que, kị khí không bắt buộc, sinh nội bào tử gây bệnh thuộc chi Clostridium [1]. *C. perfringens* được chia thành 5 nhánh chính A, B, C, D và E dựa vào loại độc tố chủ yếu mà chúng sinh ra là α-toxin, β-toxin, ε-toxin và ι-toxin [1]. *C. perfringens* có thể chịu được nhiệt độ trong khoảng từ (12 ÷ 60) ^{0}C và sinh sôi nhanh chóng từ (43 ÷ 47) ^{0}C [1], vì thế chúng có khả năng phân bố rộng rãi trong tự nhiên đặc biệt là trong đất, thức ăn, chất thải và hệ tiêu hóa của người và động vật [1].

Các phương pháp truyền thống phát hiện loài vi khuẩn thực phẩm bao gồm *C. perfringens* dựa trên nuôi cấy vi sinh, phân lập tế bào, và sinh hóa, cùng các phương pháp chẩn đoán phân tử, PCR với độ chính xác, tính đặc hiệu và độ nhạy cao. Tuy nhiên, các phương pháp này còn có những hạn chế tiêu tốn thời gian, cần thiết bị luân nhiệt, kĩ thuật viên có kinh nghiệm và khó thực hiện tại thực địa [2, 3].

Các phương pháp đẳng nhiệt, trong đó có kĩ thuật RPA (recombinase polymerase amplification) khuếch đại acid nucleic đẳng nhiệt được phát triển bởi Niall Armes vào năm 2006 [4] khắc phục được những hạn chế của các phương pháp truyền thống.

RPA thay thế quy trình biến nhiệt của phương pháp PCR, bao gồm ba protein chính trong đó protein tái tổ hợp (recombinase) T_4 UvsX làm tách mạch DNA sợi đôi ban đầu, protein liên kết DNA sợi đơn T_4 gp32 giúp

https://doi.org/10.55401/chmv6t87

mồi gắn vào vị trí tương đồng trên DNA mục tiêu, sau đó DNA polymerase (*Sau* hoặc *Bsu* polymerase) hoạt động kéo dài mồi tổng hợp mạch khuếch đại tạo sản phẩm và toàn bộ quá trình phản ứng có thể xảy ra chỉ tại một nhiệt độ. Kĩ thuật RPA là một công cụ phân tử hiệu quả, xác định các tác nhân gây bệnh một cách chính xác, nhanh chóng - phản ứng xảy ra trong khoảng thời gian (10 ÷ 30) phút, tiết kiệm chi phí do chuẩn bị mẫu đơn giản, nhiệt độ thấp (25 ÷ 42) ^{0}C, không cần máy điều nhiệt và tiện lợi do có sẵn các bộ kit thương mại đông khô [5].

Ngoài ra, có các phương pháp đọc kết quả RPA khác nhau điện di gel agarose, huỳnh quang định lượng thời gian thực (Real-time quantitative fluorescence) và que thử lateral flow - đơn giản dùng đọc kết quả RPA dựa trên nguyên tắc kháng nguyên kháng thể, theo đó sản phẩm RPA sẽ được đánh dấu bằng một kháng nguyên đặc hiệu với kháng thể có trong que thử, nhờ đó phản ứng dương tính sẽ thể hiện vạch trên que thử và có thể quan sát trực tiếp bằng mắt thường [6].

RPA đã phát hiện các chủng vi sinh thực phẩm phổ biến như *S enterica* [7], *E. coli* [8], *P. aeruginosa* [9], *L. Monocentogenes* [10] với độ nhạy, độ đặc hiệu cao, do có thể đọc kết quả nhanh, RPA trở thành một công cụ tiềm năng để phát hiện các loại vi sinh vật nói chung tại các vùng nhiễm mầm bệnh ngoài phòng thí nghiệm. Nghiên cứu này xây dựng một quy trình RPA phát hiện nhanh *C. Perfringens*, thêm một lựa chọn bên cạnh các kĩ thuật truyền thống.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Mẫu vi khuẩn

Nghiên cứu này sử dụng các chủng vi sinh vật như *C. perfringens* ATCC 10543 lưu trữ ở Viện Kĩ thuật Công nghệ cao NTT; và các mẫu phân lập của *S. enterica, S. aureus, P.aeruginosa, L. monocytogenes, B. cereus.*

2.2 Phương pháp nuôi cấy và tách chiết DNA

C. perfringens được nuôi cấy trong môi trường TSB ở nhiệt độ 37 ^{0}C. Tế bào vi khuẩn được thu nhận bằng li tâm 10.000 rpm trong 5 phút; DNA bộ gen vi khuẩn được tách chiết và tinh sạch bằng phương pháp CTAB [11]. DNA tách chiết được bảo quản trong dung dịch TE 1X tại nhiệt độ -20 ^{0}C dùng làm mạch khuôn cho các thí nghiệm [11].

2.3 Thiết kế mồi

Trong nghiên cứu này gen *plc* được lựa chọn làm gen mục tiêu phát hiện *C. perfringens* do tính ổn định, độ bảo tồn cao của trình tự gen này và đồng thời gen *plc* hiện diện trong cả năm nhánh A, B, C, D và E của *C. perfringens* [12]. Trình tự mồi RPA đặc trưng cho *C. perfringens* được thiết kế bằng phần mềm Primer3 (https//bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/). Sau khi kiểm tra các thông số mồi và khả năng phát hiện của mồi bằng PCR in silico và NCBI Blast, cặp mồi CF, CR với trình tự thể hiện tại Bảng 1 được lựa chọn, đoạn gen mục tiêu được khuếch đại bởi cặp mồi này có kích thước 230 bp. Trình tự mồi được tổng hợp bởi IDT Singapore và sử dụng làm mồi cho tất cả các thí nghiệm trong nghiên cứu này.

Bảng 1 Trình tự mồi đặc trưng cho *C. Perfringens*

Tên	Trình tự 5’ – 3’
CF	CGCGCTAGCAACTAGCCTATGGGCTGGAGC
CR	GTTCTACTTATCCAGATTATGATAAGAATG

2.4 Phương pháp PCR

Thành phần phản ứng PCR bao gồm 0,4 µM mồi CF, 0,4 µM mồi CR, 4 µL 5X Mytaq reaction buffer, 0,4 µL enzyme 2 µL DNA mạch khuôn và nước sinh học phân tử. Phản ứng được thực hiện với 30 chu kì nhiệt 94 ^{0}C 30 s , 61,6 ^{0}C 30 s và 72 ^{0}C 20 s. Sản phẩm PCR được xác định bằng phương pháp chạy điện di trên gel agarose.

2.5 Phương pháp RPA

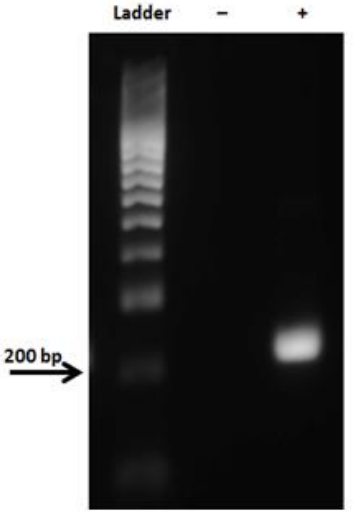
Phản ứng RPA được thực hiện với bộ kit TwistAmp® Basic (TwistDX), phản ứng RPA bao gồm 2,4 µL mồi CF (10 µM), 2,4 µL mồi CR (10 µM), 29,5 µL dung dịch đệm hoàn nguyên TwistAmp® rehydration buffer, 2 µL DNA mạch khuôn và nước sinh học phân tử. Phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ (35 ÷ 40) ^{0}C trong thời gian (15 ÷ 40) phút. Kết quả được phân tích bằng phương pháp điện di gel agarose.

3 Kết quả

3.1 Kết quả kiểm tra hoạt động của mồi

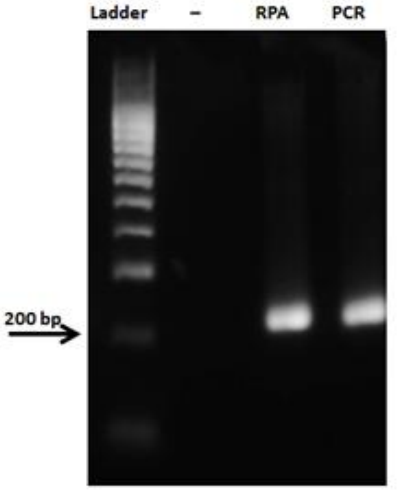
Bộ mồi RPA được thiết kế đặc trưng cho *C. perfringens* được kiểm tra khả năng hoạt động bằng phản ứng PCR thông thường và phản ứng RPA với DNA bộ gen được tách. Kết quả được thể hiện tại Hình 1 cho thấy sản phẩm PCR tạo thành có kích thước lớn hơn 200 bp so với thang chuẩn, tương đồng với kích thước sản phẩm được thiết kế, đồng thời

chứng âm không có sản phẩm tạo thành thể hiện trên gel điện di. Kết quả cho thấy bộ mồi được thiết kế có khả năng khuếch đại đúng DNA mục tiêu và có thể sử dụng cho các khảo sát tiếp theo trong nghiên cứu.



Hình 1 Kết quả PCR kiểm tra hoạt động của mồi và DNA tách chiết. Trong đó (+) phản ứng chứa DNA tinh sạch của *C.perfrigens*; (-) chứng âm, dùng nước sinh học phân tử thay cho DNA mục tiêu.

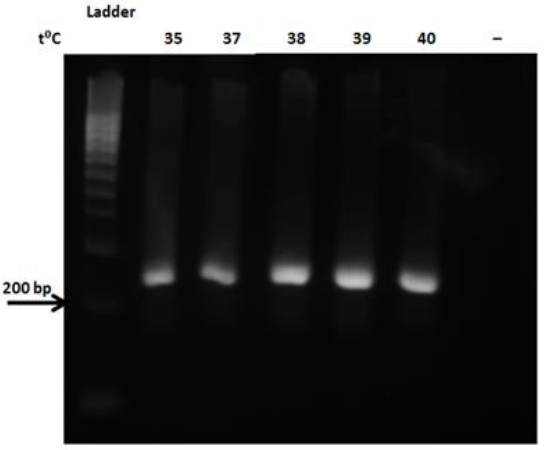
DNA đã tách chiết được dùng làm mạch khuôn để thực hiện phản ứng RPA trên Twist Amp® Basic kit với protocol RPA. Tinh sạch sản phẩm RPA bằng dung dịch PhenolChlorofromIsoarmyl Alcohol. Kết quả sản phẩm RPA song song với sản phẩm PCR. Kết quả điện di sản phẩm RPA so với sản phẩm PCR được thể hiện tại Hình 2.



Hình 2 Kết quả kiểm tra thành phần phản ứng RPA với DNA bộ gen *C. perfringens* được tách chiết. Trong đó RPA sản phẩm khuếch đại bằng RPA; PCR sản phẩm khuếch đại bằng phương pháp PCR; Ladder thang DNA 100 bp

Kết quả điện di cho thấy, vạch kết quả của phản ứng RPA trên vị trí thang 200 bp, đúng với kích thước sản phẩm mong muốn, đồng thời, kích thước sản phẩm RPA cũng tương đồng với kích thước sản phẩm của phản ứng PCR trước đó. Vì thế, cặp mồi đã sử dụng hoàn toàn phù hợp cho cả 2 phương pháp RPA và PCR để khuếch đại DNA vi khuẩn *C. perfringens*. Kĩ thuật RPA sử dụng DNA tách chiết, mồi được thiết kế phát hiện thành công đoạn gen mục tiêu của *C. perfringens*.

3.2 Kết quả khảo sát nhiệt độ phản ứng RPA

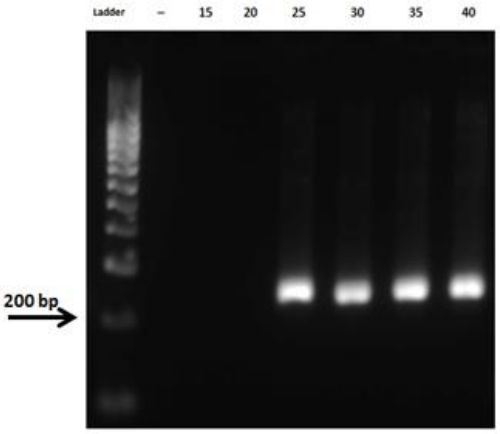


Hình 3 Kết quả khảo sát nhiệt độ tối ưu cho phản ứng RPA

Trong nghiên cứu này phản ứng RPA được khảo sát ở các mốc nhiệt độ (35, 37, 38, 39 và 40) ^{0}C. Khảo sát được lặp lại 3 lần. Kết quả điện di khảo sát sản phẩm của phản ứng RPA tại các nhiệt độ khác nhau cho thấy xuất hiện các vệt sáng với cường độ khác nhau tại các nhiệt độ phản ứng khác nhau. Sản phẩm tạo ra tại nhiệt độ phản ứng 38 ^{0}C thể hiện vạch sáng rõ nét, không có sự khác biệt về độ sáng ở sản phẩm ở nhiệt độ cao hơn. Vì thế, nhiệt độ 38 ^{0}C là nhiệt độ tối ưu cho phản ứng RPA, nhiệt độ này được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.3 Kết quả khảo sát thời gian phản ứng RPA

Thời gian kéo dài của phản ứng RPA quyết định tới số lượng DNA sản phẩm được hình thành trong phản ứng. Trong nghiên cứu này, thời gian phản ứng được khảo sát trong khoảng thời gian (15 ÷ 40) phút với các mốc phản ứng cách nhau 5 phút. Các phản ứng RPA này đều được thực hiện ở 38 ^{0}C với cùng một nồng độ DNA khuôn. Khảo sát được lặp lại 3 lần. Kết quả khảo sát phản ứng RPA tại mốc thời gian khác nhau cho thấy xuất hiện các vạch sản phẩm khác nhau tại các mốc thời gian khác nhau.

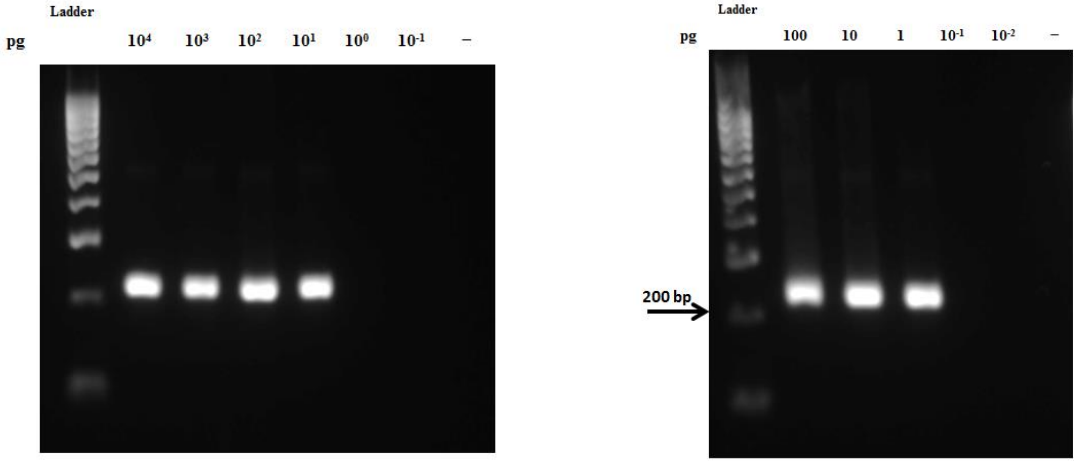


Hình 4 Kết quả khảo sát thời gian phản ứng RPA. Trong đó, các vạch sáng thể hiện sản phẩm RPA được thực hiện tại các mốc thời gian (15 ÷ 40) phút.
Ladder thang DNA 100 bp.

Thời gian tối thiểu để phản ứng RPA xảy ra có thể hiện vạch sáng trên gel điện di là 25 phút (Hình 4), đồng thời lượng sản phẩm tạo ra không có sự thay đổi lớn từ phút 25 của phản ứng. Kết quả là có sự đồng nhất giữa các lần khảo sát. Vì thế thời gian 25 phút được lựa chọn để thực hiện các phản ứng RPA tiếp theo trong nghiên cứu.

3.4 Kết quả khảo sát giới hạn phát hiện của RPA đối với DNA tách chiết

Giới hạn phát hiện của phản ứng được khảo sát với DNA tách chiết có nồng độ 1 ng được pha loãng bậc 10 về các nồng độ (100 ÷ 10^{-2}) pg và thực hiện phản ứng RPA với các điều kiện phản ứng được tối ưu trước đó để khảo sát giới hạn phát hiện của phản ứng. Kết quả khảo sát Hình 5B cho thấy, phản ứng RPA có thể xảy ra với lượng DNA thấp nhất là 1 pg có trong phản ứng. Đồng thời, kết quả quả có thấy RPA nhạy hơn phản ứng PCR (Hình 5A) thông thường 10 lần thể hiện ưu thế phản ứng nhanh nhạy của RPA trong nghiên cứu này (Hình 5).



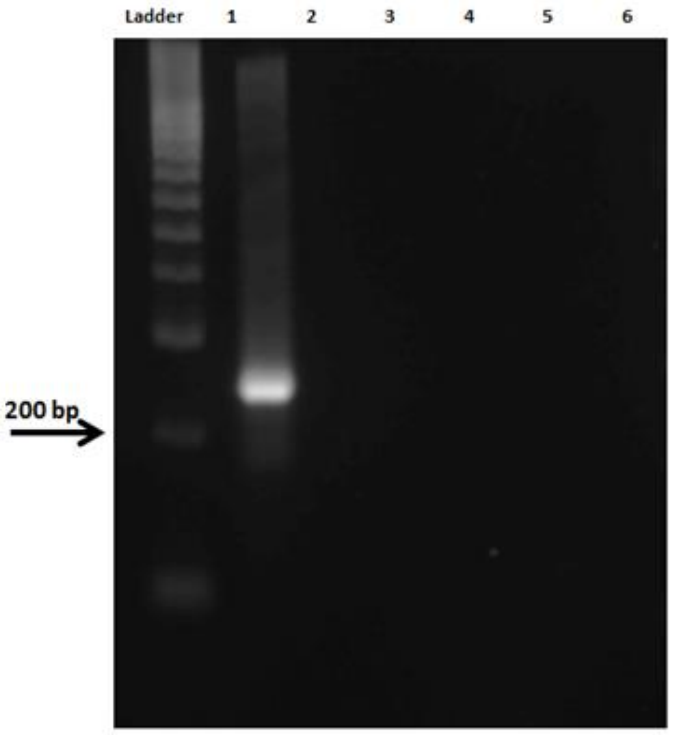
A B

Hình 5 Khảo sát giới hạn phát hiện của RPA và PCR. Trong đó
A giới hạn phát hiện phản ứng PCR B giới hạn phát hiện phản ứng RPA

3.5 Kết quả khảo sát tính đặc hiệu của mồi đối với DNA tách chiết.

Tính đặc hiệu của bộ mồi dành cho phản ứng RPA được đánh giá bằng việc thực hiện phản ứng RPA với các chủng vi khuẩn gần gũi bao gồm vi khuẩn *S. enterica*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* và *B. cereus*, các chủng vi khuẩn này là các loại phổ biến gây ngộ độc thực phẩm đồng thời thể hiện các triệu chứng gây độc trên người với nhiều điểm tương đồng *C. perfringens*. Kết quả khảo sát cho thấy phương pháp RPA đã được tối ưu trong nghiên cứu này có thể phân biệt trình tự gen mục tiêu của *C. perfringens* so với các vi khuẩn gần gũi, RPA chỉ khuếch đại khi DNA mục tiêu *C. perfringens* có trong phản ứng (Hình 6). Kết quả cho thấy, bộ mồi lựa chọn thực hiện phương pháp RPA đã được tối ưu có tính chuyên biệt cao cho *C. Perfringens*

Kết quả khảo sát cho thấy phương pháp RPA đã được tối ưu trong nghiên cứu này có thể phân biệt trình tự gen mục tiêu của *C. perfringens* so với các vi khuẩn gần gũi, RPA chỉ khuếch đại khi DNA mục tiêu *C. perfringens* có trong phản ứng, Hình 6. Kết quả cho thấy, bộ mồi lựa chọn thực hiện phương pháp RPA đã được tối ưu có tính chuyên biệt cao cho *C. perfringens*.



Hình 6 Kết quả khảo sát tính đặc hiệu của bộ mồi RPA. Trong đó 1 *C. perfringens*; 2 *S. enterica*; 3 *S. aureus*; 4 *P. aeruginosa*; 5 *L. monocytogenes* và 6 *B. cereus*.

4 Kết luận

Vi sinh thực phẩm luôn là mối quan tâm hàng đầu trong lĩnh vực vệ sinh an toàn thực phẩm hiện nay, trong đó *C.perfringens* là một trong những vi sinh vật phổ biến hàng đầu, gây nên nhiều vụ ngộ độc thực phẩm tại Việt Nam. Thực tế cho thấy việc kiểm soát vi khuẩn gây bệnh trong thực phẩm luôn đòi hỏi phát triển các kĩ thuật mới nhanh, chính xác, đơn giản và có thể thực hiện tại chỗ trong điều kiện hạn chế về thiết bị. Nghiên cứu này sử dụng phương pháp RPA để phát hiện nhanh *C. perfringens*. Dựa trên nguyên lí khuếch đại của PCR với việc sử dụng hai mồi, RPA kết hợp các loại protein tái tổ hợp và DNA polymerase để thực hiện khuếch đại đoạn gen mục tiêu tại một nhiệt độ cố định. Nghiên cứu đã thành công trong việc phát hiện *C. perfringens* bằng phản ứng RPA trong thời gian phản ứng 25 phút tại nhiệt độ 38 ^{0}C. Phản ứng có khả năng phát hiện 1 pg DNA tinh sạch của *C. perfringens*, nhạy hơn 10 lần so với PCR. khi sử dụng cùng một bộ mồi. Các kết quả này thể hiện khả năng ứng dụng cao của phương pháp RPA trong vi sinh thực phẩm, đồng thời tạo tiền đề phát triển các bộ kit phát hiện nhanh trong các nghiên cứu tiếp theo.

Tài liệu tham khảo

1. Navarro M.A., McClane B.A., and Uzal F.A. (2018). Mechanisms of Action and Cell Death Associated with Clostridium perfringens Toxins. Toxins (Basel), 10(5).
2. Zhao, X., Lin, C.-W., Wang, J. & Oh, D. H. Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24, pp. 297–312 (2014).
3. Li, J. *et al.* Recombinase Polymerase Amplification (RPA) Combined with Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of Salmonella in Food. *Foods* 9, (2019).
4. Piepenburg, O., Williams, C. H., Stemple, D. L., & Armes, N. A. (2006). DNA detection using recombination proteins. PLoS biology, 4(7), e204.
5. Li, J., Macdonald, J., & von Stetten, F. (2018). Review a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification. The Analyst, 144(1), pp. 31–67.
6. Lobato, I. M. & O'Sullivan, C. K. Recombinase polymerase amplification Basics, applications and recent advances. *Trends Anal. Chem.* 98, pp. 19–35 (2018).
7. Wu, H. et al. A Recombinase Polymerase Amplification and Lateral Flow Strip Combined Method That Detects Salmonella enterica Serotype Typhimurium With No Worry of Primer-Dependent Artifacts. Front. Microbiol. 11, (2020).
8. Hu, J. et al. Rapid analysis of Escherichia coli O157H7 using isothermal recombinase polymerase amplification combined with triple-labeled nucleotide probes. Mol. Cell. Probes 50, 101501 (2020).
9. Jin, X. J. et al. Application of recombinase polymerase amplification in the detection of Pseudomonas aeruginosa. Zhonghua Shao Shang Za Zhi Zhonghua Shaoshang Zazhi Chin. J. Burns 34, pp. 233–239 (2018).
10. Du, X.-J., Zang, Y.-X., Liu, H.-B., Li, P. & Wang, S. Recombinase Polymerase Amplification Combined with Lateral Flow Strip for Listeria monocytogenes Detection in Food. J. Food Sci. 83, pp. 1041–1047 (2018).
11. William S. and Helene Feil, A. Copeland. JGI-Bacterial-DNA-isolation-CTAB-Protocol-2012.
12. Petit, L., Gibert, M. & Popoff, M. R. Clostridium perfringens toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.* 7, pp. 104–110 (1999).

Rapid detection Clostridium perfringens by recombinase polymerase ampification (RPA)

Diem Hong Tran[2*], Lam Ngoc Ngan Anh[1]
[1]International University, Vietnam National University Ho Chi Minh City
[2]NTT Hi Tech Institute
[*]thdiem@ntt.edu.vn

Abstract *Clostridium perfringens* has been considered as one of pathogens contributing to foodborne illness ranking only after *Salmonella*. *C. perfringens* is a Gram-positive, anaerobic bacterium, which can be abundantly found in the wide range of places such as soil, animal intestine and frozen meat. *C. perfringens* causes food poisoning in human with stomachache and diarrhea. In order to detect this pathogenic bacterium, several isolated, cultured, biochemical methods as well as PCR technique could be performed under complicated processes which is time-consuming. This also requires experienced technicians and an expensive thermal cycler. This study applies RPA (recombinase polymerase amplification) isothermal nucleic acid amplification technique to rapidly detect *Clostridium perfringens*. RPA has a short reaction time for target DNA replication, is performed at only one temperature, and achieves high sensitivity and specificity. The results have established an accurate detection procedure characteristic of *C. perfringens* in 25 minutes at 38 ^{0}C, 10 times more sensitive than PCR techniques, creating a premise for direct detection. *C. perfringens* on food samples.

Keywords *C. perfringens*, RPA, isothermal