



Research Article

Producing positive control materials for template in PCR testing to detect botulinum neurotoxin types A and B genes

Ninh Thi Hanh^{*}, Le Vinh Hoa, Tran Hong Ba, Pham Van Quan,
Le Thanh Long, Pham Thi Loan

National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

(Received: 22 Dec 2023; Revised: 07 Mar 2024; Accepted: 21 Mar 2024)

Abstract

Botulinum neurotoxin (BoNT) is produced by the bacterium *Clostridium botulinum* and some other bacterial strains such as *C. butyricum* and *C. baratii*. It is considered the strongest toxin known to humans and can cause botulism. Botulinum neurotoxin can be fatal in humans and most botulism cases are caused by type A and B toxins. In this study, the research team used *C. botulinum* strains isolated from botulism poisoning cases in Vietnam, which were identified to produce type A and B toxins, from which we successfully transformed plasmids carrying genes specific for BoNT type A and type B genes based on the reference gene sequence according to TCVN 11395:2016. These plasmids were successfully used as template DNA for PCR reactions. In the PCR reaction, plasmids used to transform genes producing botulinum toxin types A and B have a detection limit of 10^2 copies/ μ L. The study has fully verified the validation parameters, with 100% accuracy and specificity.

Keywords: neurotoxin, *Clostridium botulinum*, food poisoning, PCR.

^{*} Corresponding author: Ninh Thi Hanh (E-mail: ninhhanh891997@gmail.com)

Doi: <https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.4209>

Tạo nguyên liệu chứng dương ứng dụng trong thử nghiệm PCR phát hiện gen sinh độc tố thần kinh botulinum type A và B

Ninh Thị Hạnh, Lê Vinh Hoa, Trần Hồng Ba, Phạm Văn Quân,
Lê Thành Long, Phạm Thị Loan

Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia, Hà Nội, Việt Nam

Tóm tắt

Độc tố thần kinh botulinum (BoNT) được sinh ra bởi vi khuẩn *Clostridium botulinum* và một số chủng thuộc loài vi khuẩn *C. butyricum* và *C. baratii* hiện được coi là chất độc mạnh nhất mà loài người biết đến. Độc tố BoNT type A và type B là hai loại độc tố phổ biến nhất được biết đến gây ngộ độc cho con người, nhiều trường hợp có thể dẫn đến tử vong. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu tạo được nguyên liệu chứng dương bằng kỹ thuật nhân dòng và ứng dụng trong thử nghiệm PCR nhằm phát hiện gen sinh độc tố thần kinh botulinum type A và type B giúp chủ động trong phát hiện, chẩn đoán và điều trị ngộ độc do BoNT gây ra. Nhóm nghiên cứu dựa trên trình tự đoạn gen tham khảo trong TCVN 11395:2016 và ngân hàng Genbank để thiết kế ra hai cặp mồi mới có cùng nhiệt độ bắt cặp, mỗi cặp mồi đặc trưng cho gen sinh độc tố thần kinh botulinum type A và type B. Trình tự toàn bộ đoạn gen đích sau khi biến nạp thành công vào các plasmid được sử dụng làm chứng dương cho phản ứng PCR. Bộ chứng dương được thiết lập bằng cách pha loãng theo cấp số 10 dải nồng độ từ $10^8 - 10^1$ copies/ μ L với độ tinh sạch A260/280 đạt từ 1,6 ÷ 2,2. Trong phản ứng PCR sử dụng plasmid biến nạp thành công gen sinh độc tố botulinum type A và type B ứng dụng cho thấy có độ nhạy cao với giới hạn phát hiện ở 10^2 copies/ μ L, độ chính xác, độ đặc hiệu và độ nhạy đều đạt 100%.

Từ khóa: độc tố thần kinh, *Clostridium botulinum*, ngộ độc, PCR.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Clostridium botulinum (*C. botulinum*) là một loại trực khuẩn hình que, gram dương, kỵ khí, lầy năng lượng để phát triển bằng cách lên men. Độc tố thần kinh botulinum (BoNT) hình thành trong quá trình phát triển dạng bào tử của vi khuẩn *C. botulinum*, là chất độc mạnh nhất mà loài người từng biết đến cho tới hiện nay. Ngộ độc bởi độc tố BoNT gây ra sẽ khiến động vật hoặc con người rơi vào trạng thái tê liệt biểu hiện qua các triệu chứng liệt mềm do sự ức chế dẫn truyền tín hiệu thần kinh, gây ra hậu quả nghiêm trọng đe dọa tính mạng con người [1, 2]. Dựa trên tính đặc hiệu kháng nguyên của độc tố được tạo ra, có bảy type độc tố botulinum được biết đến (type A đến G), trong đó độc tố type A và B được biết đến là nguyên nhân chính gây tử vong ở người và hầu hết những ca ngộ độc ở trẻ sơ sinh [1, 2, 3].

Tính đến thời điểm hiện tại, tiêu chuẩn vàng để phát hiện sự có mặt của vi khuẩn *C. botulinum* và độc tố BoNT là phương pháp nuôi cấy truyền thống kết hợp phát hiện độc tố thần kinh bằng thử nghiệm độc tính trên chuột. Phương pháp này có độ nhạy cao từ 10 - 30 pg độc tố trong mẫu thử nghiệm nhưng thời gian tiến hành kéo dài và phải đối mặt với vấn

đề đạo đức và quyền động vật do sử dụng động vật làm thí nghiệm [4]. Bằng kỹ thuật sinh học phân tử, PCR cung cấp một giải pháp thay thế nhanh chóng cho sàng lọc ban đầu đối với các chủng vi khuẩn họ Clostridia sản sinh độc tố BoNT [5, 6]. Tuy nhiên, quá trình thực hiện phản ứng PCR trong phát hiện gen sinh độc tố thần kinh botulinum tại các phòng thử nghiệm trong nước gặp nhiều khó khăn do nguồn cung ứng mẫu chuẩn chứng dương tồn tại nhiều hạn chế về mặt chi phí, thời gian thông quan và có những nguy cơ trong an toàn sinh học phòng xét nghiệm khi chứng dương hiện nay đều sử dụng từ các chủng *C. botulinum* mang gen sinh độc tố. Chính vì vậy, hướng nghiên cứu tạo nguyên liệu chứng dương ứng dụng trong thử nghiệm PCR nhằm phát hiện chính xác *C. botulinum* mang gen sinh độc tố thần kinh botulinum type A và type B cho phép chủ động về nguồn mẫu chuẩn chứng dương cơ sở trong thiết kế, đánh giá kỹ thuật cũng như khắc phục được những đòi hỏi khắt khe về an toàn sinh học khi thao tác trực tiếp với mẫu có nguy cơ.

Tính đến nay, các nhà khoa học trên thế giới đã nghiên cứu và sàng lọc ra các trình tự DNA có thể đưa vào sử dụng trong thực tiễn để phát hiện vi khuẩn *C. botulinum* hay gen sinh độc tố thần kinh botulinum [7, 8] sử dụng phương pháp PCR hay phương pháp real-time PCR [9, 10]. Các tác giả Lindstrom, Fencia và Yoon cùng các cộng sự đã thiết kế các trình tự mỗi đặc hiệu dựa trên trình tự gen quy định trình tự protein của các type độc tố thần kinh botulinum được công bố trên ngân hàng trình tự gen thế giới (GenBank) [7]. Các nghiên cứu này đã được trích dẫn và công nhận bởi các tổ chức an toàn thực phẩm như FDA [11]. Các nghiên cứu này đã nghiên cứu tính sàng lọc sử dụng chủng chuẩn từ ngân hàng chủng chuẩn thế giới ATCC cũng như các chủng *C. botulinum* được phân lập từ nhiều vụ ngộ độc trên toàn thế giới (Nhật Bản, Đan Mạch, ...) để xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của trình tự mỗi được thiết kế.

Các nghiên cứu trên là nguồn thông tin tham khảo tin cậy với các trình tự tiềm năng để đưa vào trong nghiên cứu tạo chứng dương của nhóm đề tài với kết quả đạt giới hạn phát hiện ở mức 10^2 bào tử/mẫu với các vi khuẩn mang gen sinh độc tố BoNT type A, E, F và 10^1 bào tử/mẫu với các vi khuẩn mang gen sinh độc tố BoNT type B khi sử dụng phương pháp PCR [8].

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng/ vật liệu nghiên cứu

Các chủng *C. botulinum* phân lập được trong các vụ ngộ độc do pate chay và bún riêu chay năm 2020-2021 đã được định danh bằng kỹ thuật MALDI-TOF hoặc giải trình tự gen và được lưu giữ tại Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia.

2.2. Hóa chất, chủng chuẩn

2.2.1. Hóa chất, dụng cụ và thiết bị

Nghiên cứu sử dụng các hóa chất chính sau: Cooked Meat Medium (BD, Mỹ), BHI broth (Merck, Đức), PCR Master Mix 2X (Thermo), thang DNA kích thước từ 50 bp đến 1.000 bp (Thermo), Agarose (Thermo), thuốc nhuộm DNA (Intron), Đệm TAE 1X (Thermo), bộ kit tách chiết DNA - GeneJET Genomic DNA Purification (Thermo), vector nhân dòng pGEM-T (Promega), Bộ kit QIAprep® Spin Miniprep (QIAGEN), bộ kit tinh

sạch “ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent” (Thermo), bộ BigDye® Terminator Sequencing Kit v3.1 (Thermo). Các hoá chất còn lại đều đáp ứng yêu cầu dùng cho nghiên cứu sinh học phân tử.

Các máy móc và trang thiết bị chính được dùng trong nghiên cứu bao gồm: máy PCR S1000 (Biorad), máy ly tâm lạnh Hettich MIRKO 220R (Hettich, Đức), thiết bị điện di ngang (Biorad), máy đo quang phổ Nanodrop (Thermo), hệ thống chụp ảnh gel Geldoc (Biorad), hệ thống máy giải trình tự SeqStudio Genetic Analyzer 3500 (Biosystems®, Mỹ).

2.2.2. Chứng chuẩn

Nghiên cứu sử dụng các chủng chuẩn *Clostridium botulinum* type A, B; *Clostridium botulinum* type B; *Clostridium botulinum* type E; *Clostridium botulinum* không mang gen sinh độc tố phân lập được trong các vụ ngộ độc do pate chay và bún riêu chay năm 2020-2021. Ngoài ra, 13 chủng các loài vi khuẩn khác cũng được đưa vào nghiên cứu (Bảng 1).

Bảng 1. Danh mục chủng chuẩn

Nhóm	STT	Các chủng	Số lượng chủng	Type gen độc tố thần kinh botulinum thử nghiệm	
				Type A	Type B
I	1.	<i>C. botulinum</i> type A & type B ^a	1	x	x
	2.	<i>C. botulinum</i> type B ^a	1	x	x
II	3.	<i>Clostridium botulinum</i> không mang gen sinh độc tố ^a	1	x	x
	4.	<i>Clostridium botulinum</i> type E ^a	1	x	x
	5.	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	1	x	x
	6.	<i>Clostridioides difficile</i> 1184 (A-B+) ^a	1	x	x
	7.	<i>Clostridioides difficile</i> 2365 (A+B+) ^a	1	x	x
	8.	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1	x	x
	9.	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	1	x	x
	10.	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1	x	x
	11.	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis ATCC 13076	1	x	x
	12.	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	1	x	x
	13.	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	1	x	x
	14.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1	x	x
	15.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1	x	x
	16.	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16888	1	x	x
	17.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	1	x	x

^a Các chủng phân lập đã được định danh bằng kỹ thuật MALDI–TOF hoặc kỹ thuật giải trình tự gen để xác định loài và xác định gen sinh độc tố trước khi tiến hành thử nghiệm.

ATCC bộ sưu tập chủng chuẩn tại Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp chuẩn bị mẫu thử và tách chiết DNA

* Chuẩn bị mẫu thử

Tổng cộng có 17 chủng được đưa vào phục vụ cho nghiên cứu (Bảng 1). Các chủng *Clostridium botulinum* mang gen sinh độc tố type A, type B, type E và chủng *Clostridium botulinum* không mang gen sinh độc tố được nuôi tăng sinh trên môi trường canh thang Cooked meat, ủ 18-24 giờ trong điều kiện kỵ khí (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) ở 37°C.

Các chủng *Clostridium perfringens*, *Clostridioides difficile* được nuôi cấy trên môi trường canh thang Thioglycolate (Merck, Đức), ủ 18-24 giờ trong điều kiện kỵ khí ở 37°C; các chủng *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae* nuôi trên môi trường canh thang Sabouraud (BD, Mỹ), ủ 72 giờ ở 25°C. Tất cả các chủng còn lại được nuôi cấy trên môi trường canh thang BHI (Brain Heart Infusion broth), ủ ở 37°C trong 18-24 giờ.

* Phương pháp tách chiết DNA

DNA tổng số được tách chiết từ các dịch chủng nuôi cấy tăng sinh qua đêm theo quy trình của bộ kit GeneJET Genomic DNA Purification. Nồng độ DNA tổng số của *C. botulinum* được định lượng bằng máy nanodrop tại bước sóng 260 nm. Dung dịch chứa DNA được bảo quản ở nhiệt độ -20°C cho đến khi sử dụng.

2.3.2. Kỹ thuật PCR

* Thiết kế mồi

Dựa trên trình tự gen BoNT đã được công bố trên cơ sở dữ liệu trình tự GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) để thiết kế hai cặp mồi mới đặc hiệu cho *C. botulinum* type A và type B. Các cặp mồi được chọn từ các vùng không tương đồng của gen BoNT type A và B bằng cách sử dụng phần mềm primer-blast: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

* Nhân bản đoạn gen sinh độc tố thần kinh botulinum type A và B bằng PCR

Thành phần cho mỗi phản ứng bao gồm PCR master mix 2X, 10 μM mồi xuôi và 10 μM mồi ngược, DNA khuôn (nồng độ từ 100 - 200 ng), tổng thể tích phản ứng là 20 μL. Chu trình nhiệt cho phản ứng sử dụng mồi CbA3 và mồi CbB3 được thực hiện theo trình tự đưa ra trong TCVN 11135:2015 [12] có điều chỉnh nhiệt độ gắn mồi như sau: 95°C - 10 phút để biến tính DNA, tiếp nối 40 chu kỳ gồm 3 bước: i) biến tính DNA ở 95°C - 40 giây; ii) gắn mồi ở 55°C - 40 giây; iii) kéo dài chuỗi ở 72°C - 40 giây. Cuối cùng, hỗn hợp được ủ ở 72°C, 10 phút để đảm bảo tất cả các đoạn DNA đang được tổng hợp đều hoàn tất, sau đó các mẫu được giữ ở 4°C đến khi phân tích.

* Đánh giá hiệu năng cặp mồi

Bằng việc sử dụng khuôn DNA được tách chiết từ 17 chủng nghiên cứu (Bảng 1), thực hiện xác nhận, đánh giá hiệu năng cặp mồi bằng phép thử chọn lọc mục tiêu và phép thử chọn lọc loại trừ. Thiết kế thí nghiệm dựa trên TCVN 11135:2015 [12]. Sản phẩm nhân bản gen bằng kỹ thuật PCR được kiểm tra bằng điện di DNA trên gel agarose 1,5% bổ sung Redsafe 20.000X để kiểm tra kết quả.

2.3.3. Nhân dòng đoạn gen mã hóa độc tố thần kinh botulinum type A và B

Sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen BoNT type A và BoNT type B sau khi được kiểm tra trên gel agarose 1,5%, được sử dụng để gắn trực tiếp vào vector nhân dòng pGEM-T Easy (Promega). Thành phần của phản ứng gắn sản phẩm PCR vào vector đầu T trên tổng thể tích 10 µl như sau: 2 µL sản phẩm PCR, 1 µL T4 DNA ligase, 5 µL T4 DNA ligase buffer 2X, 1 µL vector pGEM-T Easy (50 ng) và 1 µL nước loại ion khử trùng. Hỗn hợp được ủ ở 4°C qua đêm và sau đó được bảo quản ở nhiệt độ -20°C. Tiếp theo, vector pGEM-T Easy mang đoạn chèn được biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10 bằng phương pháp sốc nhiệt, thể biến nạp được chọn lọc bằng phương pháp khuẩn lạc xanh - trắng trên đĩa Petri chứa môi trường TSA có bổ sung 50 µg/mL ampicillin + 100 mM IPTG (0,1 M) và 20 µL X-Gal (50 mg/mL), ủ ở 37°C trong 18 - 20 giờ.

2.3.4. Kỹ thuật PCR và giải trình tự đoạn gen - Sanger sequencing kiểm tra đoạn gen đích

* Kỹ thuật PCR kiểm tra đoạn gen đích trên plasmid

Các khuẩn lạc trắng được hình thành trên đĩa thạch TSA được coi là vi khuẩn *E. coli* biến nạp thành công với plasmid có chứa gen BoNT type A và BoNT type B. Thu 01 khuẩn lạc bằng que cấy và cho vào 10 mL dung dịch BHI lỏng có bổ sung ampicillin với nồng độ 50 µg/mL. Hỗn hợp được đặt qua đêm ở 37°C. Các bước tách plasmid được thực hiện theo bộ kit QIAprep® Spin Miniprep theo nguyên lý ly giải bằng kiềm. Khuôn DNA của plasmid được PCR kiểm tra sự có mặt của DNA đích và DNA pUC19 của vector pGEM-T Easy nhằm xác minh quá trình biến nạp thành công bằng việc sử dụng các cặp mồi CbA3, CbB3 và cặp mồi pUC19 “pUC19-For (5' GCT GCA AGG CGA TTA AGT TG 3'), pUC19-Rev (5' GTT GTG TGG AAT TGT GAG CG 3')”. Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di trên gel agarose 1,5% bổ sung Redsafe 20.000X để kiểm tra kết quả.

* Giải trình tự đoạn gen – Sanger sequencing kiểm tra đoạn gen đích

Kiểm tra trình tự của đoạn gen được biến nạp vào plasmid theo quy trình của bộ kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol. (PN 4337035) (ThermoFisher). Sau khi kiểm tra và kết quả cho thấy có sự có mặt của vector pUC19 trên plasmid bằng điện di trên gel agarose 1,5%. Thực hiện giải trình tự đoạn gen được biến nạp vào plasmid bằng việc sử dụng cặp mồi pUC19 để so sánh độ tương đồng của đoạn gen đích BoNT type A và BoNT type B với ngân hàng genbank. Trình tự DNA tương ứng với từng gen đích được tiến hành so sánh với dữ liệu của ngân hàng gen Mỹ (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.3.5. Xác định các thông số của nguyên liệu chứng dương – Plasmid mang đoạn gen BoNT type A và Plasmid mang đoạn gen BoNT type B bằng phản ứng PCR

Các thông số bao gồm giới hạn phát hiện (LOD), độ chính xác (accuracy-AC, ≥ 90%), độ đặc hiệu (Specificity- SP, ≥ 90%), độ nhạy (sensitivity-SE, ≥ 90%) được xác định dựa trên các công thức sau [13 - 14]:

$$\text{Độ chính xác} \quad AC = \frac{TP + TN}{N} \times 100$$

$$\text{Độ đặc hiệu} \quad SP = \frac{TN}{TN + FP} \times 100$$

$$\text{Độ nhạy} \quad SE = \frac{TP}{TP + FN} \times 100$$

Trong đó: TP (True Positive): Dương tính đúng (Mẫu chứng có kết quả dương tính, kết quả phân tích cho kết quả dương tính)

FP (False Positive): Dương tính giả (Mẫu chứng có kết quả âm tính, kết quả phân tích cho kết quả dương tính)

FN (False Negative): Âm tính giả (Mẫu chứng có kết quả dương tính, kết quả phân tích cho kết quả âm tính)

TN (True Negative): Âm tính đúng (Mẫu chứng có kết quả âm tính, kết quả phân tích cho kết quả âm tính)

$N = TP + FP + FN + TN$: Tổng số các kết quả

Số lượng bản copy/ μL được tính dựa trên nồng độ DNA đo được theo máy đo NanoDrop. Công thức tính như sau:

$$\text{copies} = \frac{\text{khối lượng (ng)} \times 6.022 \times 10^{23}}{\text{chiều dài (bp)} \times 1 \times 10^9 \times 650}$$

LOD = nồng độ DNA mà ở đó có ít nhất 90% mẫu phân tích có kết quả dương tính.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Thiết kế cặp mồi

Dựa trên trình tự gen BoNT type A và type B đã được công bố trên ngân hàng GenBank của *C. botulinum* type A (mã truy cập X52066.1) và *C. botulinum* type B (mã truy cập Z11934.1) thì hai cặp mồi mới, mỗi cặp mồi đặc hiệu cho *C. botulinum* sinh độc tố type A và *C. botulinum* sinh độc tố type B đã được thiết kế bằng việc sử dụng phần mềm primer-blast (Bảng 2).

Bảng 2. Trình tự cặp mồi đặc hiệu cho đoạn gen sinh độc tố thần kinh botulinum type A và B

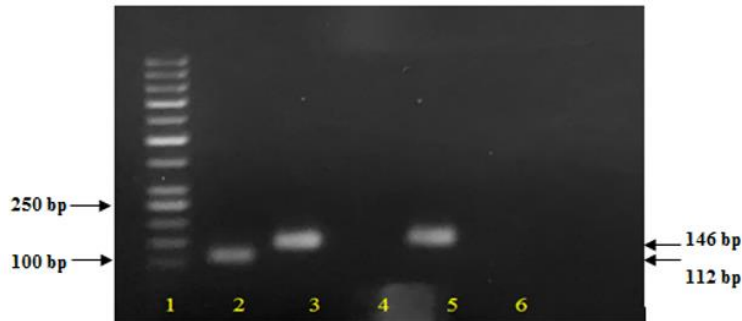
Type	Mồi	Trình tự (5' - 3')	Tm (°C)	Kích thước amplicon (bp)	Vị trí gen	% GC
A	CbA3 Fw	TACGCGAAATGGTTATGGCT	57,68	112	602 - 620	45,00
	CbA3 Rv	TTTGCCTGCACCTAAAAGAGG	58,76		712 - 692	47,62
B	CbB3 Fw	TAATCCAGGAGAAGTGGAGCG	59,24	146	485 - 505	52,38
	CbB3 Rv	GCATTATACCCCGAAGCCT	59,60		630 - 611	55,00

3.2. Đánh giá hiệu năng cặp mồi với điều kiện phản ứng PCR khuếch đại các đoạn gen đặc hiệu cho vi khuẩn *C. botulinum* mang gen sinh độc tố type A và type B

Các mẫu DNA tổng số tách từ 17 chủng (Bảng 1) có nồng độ nằm trong khoảng (15,91 - 38,5) ng/ μL với tỉ số A260/A280 nằm trong khoảng (1,6 - 2,2). Các mẫu được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu cho gen sinh độc tố type A và type B để đánh giá hiệu năng cặp mồi với tiêu chí được lựa chọn là “Phép thử chọn lọc mục tiêu và phép thử chọn lọc loại trừ”.

3.2.1. Kết quả phép thử chọn lọc mục tiêu

Phép thử chọn lọc mục tiêu của phương pháp được thử nghiệm với 01 chủng *Clostridium botulinum* mang gen sinh độc tố type A và type B và 01 chủng *Clostridium botulinum* sinh độc tố type B (Bảng 1 – Nhóm I). Kết quả được thể hiện tại Hình 1.



Hình 1. Điện di đồ sản phẩm PCR trong phép thử chọn lọc dương (Giếng: 1. DNA ladder 50bp; 2- 3. Sản phẩm PCR khuôn DNA chủng *C. botulinum* type A & B với cặp mồi CbA3 và CbB3; 4-5. Sản phẩm PCR khuôn DNA chủng *C. botulinum* type B với cặp mồi CbA3 và CbB3; 6. Đối chứng âm).

Kết quả trong Hình 1 cho thấy băng nhân bản có kích thước phù hợp với dữ liệu xây dựng được bằng công cụ Primer Blast. Cụ thể, chủng *C. botulinum* type A & B cho kết quả một băng nhân bản kích thước 112 bp khi dùng cặp mồi CbA3 đặc hiệu cho gen BoNT type A và một băng 146 bp khi dùng cặp mồi CbB3 đặc hiệu cho gen BoNT type B. Chủng *C. botulinum* type B cho một băng 146 bp khi dùng cặp mồi CbB3 đặc hiệu cho gen BoNT type B. Từ kết quả phép thử chọn lọc mục tiêu, nhóm nghiên cứu lựa chọn sản phẩm PCR khuôn DNA chủng *Clostridium botulinum* mang gen sinh độc tố type A và type B để sử dụng làm nguyên liệu tạo chứng dương cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.2. Kết quả phép thử chọn lọc loại trừ

Phép thử chọn lọc loại trừ của phương pháp được thử nghiệm trên 15 chủng vi sinh vật không phải đích (Bảng 1 - Nhóm II). Kết quả cho thấy không quan sát được các phản ứng chéo của cặp mồi với các vi khuẩn không phải đích, chi tiết thể hiện tại Hình 2 và Hình 3.



Hình 2. Điện di đồ sản phẩm PCR trong phép thử chọn lọc loại trừ sử dụng chủng không phải đích và cặp mồi CbA3 (Giếng 1. DNA ladder 50bp; 2-16. Sản phẩm PCR khuôn DNA chủng không phải đích - có tên tương ứng STT 3 – 17 của Bảng 1 với cặp mồi CbA3; 17. Đối chứng âm; 18. Đối chứng dương)

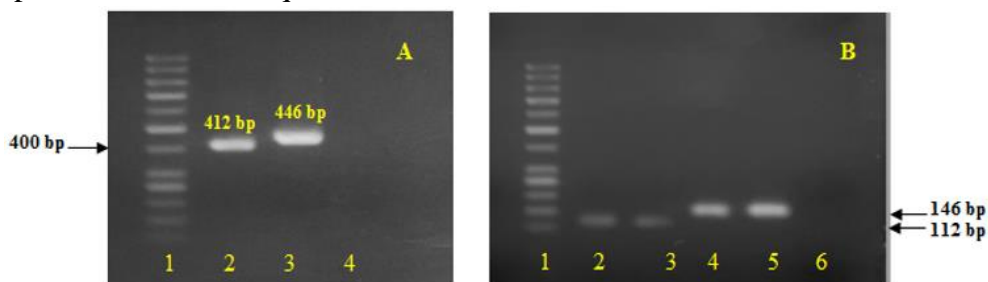


Hình 3. Điện di đồ sản phẩm PCR trong phép thử chọn lọc âm, sử dụng chủng không phải đích và cặp môi CbB3 (Giếng 1. DNA ladder 50bp; 2-16. Sản phẩm PCR khuôn DNA chủng không phải đích - có tên tương ứng STT. 3 – 17 của Bảng 1 với cặp môi CbB3; 17. Đối chứng âm; 18. Đối chứng dương)

Từ kết quả đánh giá phép thử chọn lọc mục tiêu và phép thử chọn lọc loại trừ cho thấy các cặp môi thiết kế mang lại các sản phẩm khuếch đại sắc nét và kích thước phù hợp với dữ liệu xây dựng được bằng công cụ Primer Blast và kết quả cũng cho thấy không quan sát được các phản ứng chéo của cặp môi với các khuôn DNA của chủng vi khuẩn không phải đích. Do đó, cặp môi CbA3, CbB3 và chu trình nhiệt được lựa chọn sử dụng cho các thử nghiệm về sau trong nghiên cứu.

3.3. Kết quả nhân dòng các đoạn gen đặc hiệu cho vi khuẩn *C. botulinum* mang gen sinh độc tố type A và type B

Các đoạn gen CbA3 kích thước 112 bp và CbB3 kích thước 146 bp sau khi được nhân bản bằng PCR, sẽ được gắn vào vector nhân dòng pGEM-T Easy và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* chủng TOP10. Kết quả nuôi cấy các hỗn hợp biến nạp qua đêm cho thấy có sự xuất hiện của khuẩn lạc màu trắng, là các khuẩn lạc *E. coli* đã biến nạp thành công vector plasmid pGEM-T Easy và đã gắn thành công đoạn gen nhân dòng vào giữa trình tự gen *lacZ*. Để xác định tính hiệu quả của việc nhân dòng, DNA plasmid từ một vài khuẩn lạc trắng được tách chiết và kiểm tra sự có mặt của vector cùng với hai gen CbA3, CbB3 bằng PCR sử dụng cặp môi đặc hiệu. Kết quả được chỉ ra ở Hình 4.

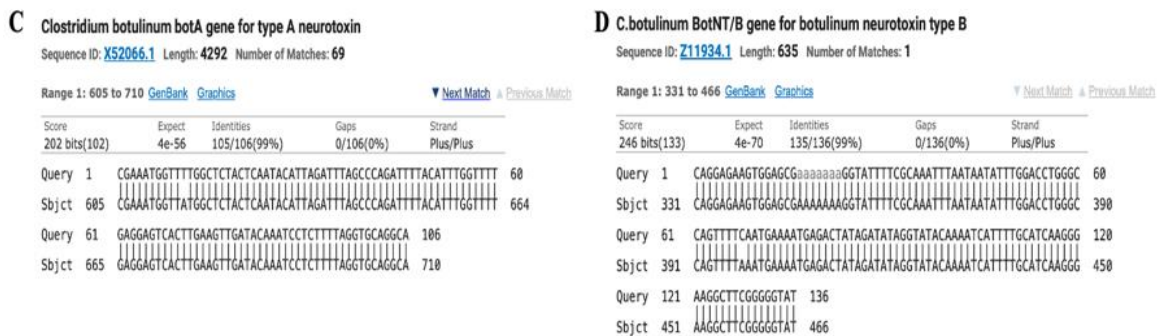


Hình 4. Kết quả biến nạp hai plasmid mang đoạn gen CbA3 và CbB3 (A. Giếng: 1. DNA ladder 50kb; 2-3 (phản ứng PCR sử dụng môi pUC19) 2. Plasmid pGEM-T Easy gắn đoạn gen CbA3; 3. Plasmid pGEM-T Easy gắn đoạn gen CbB3; 4. đối chứng âm; B. Giếng: 1. DNA ladder 50kb; 2-3: (phản ứng PCR sử dụng môi CbA3) 2. đối chứng dương; 3. Plasmid pGEM-T Easy gắn đoạn gen CbA3; 4-5: (phản ứng PCR sử dụng môi CbB3) 4. Đối chứng dương CbB3; 5. Plasmid pGEM-T Easy gắn đoạn gen CbB3; 6. Đối chứng âm)

Kết quả điện di (Hình 4. A và B) cho thấy mẫu sử dụng khuôn plasmid gắn đoạn gen CbA3 với cặp mồi đặc hiệu vector pGEM-T Easy - pUC19 cho một băng sáng rõ có kích thước phù hợp với tính toán lí thuyết là 412 bp và khuôn plasmid này với cặp mồi đặc hiệu cho gen CbA3 cho một băng sáng rõ có kích thước 112 bp. Tương tự, mẫu sử dụng khuôn plasmid gắn đoạn gen CbB3 với cặp mồi đặc hiệu cho vector pGEM-T cho một băng sáng rõ có kích thước khoảng 446 bp phù hợp với tính toán lí thuyết và với cặp mồi đặc hiệu cho gen CbB3 cũng cho một băng sáng rõ với kích thước 146 bp.

Các kết quả trên chứng tỏ rằng chúng tôi đã nhân dòng thành công đoạn gen CbA3 kích thước 112 bp và đoạn gen CbB3 kích thước 146 bp vào vector pGEM-T Easy. Các plasmid tái tổ hợp này được sử dụng làm nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo.

Để khẳng định chắc chắn đoạn DNA của gen CbA3 và CbB3 trong vector tái tổ hợp nhận được chính xác là hai gen mong muốn, DNA tái tổ hợp mang hai gen này được tách chiết, tinh sạch với số lượng lớn đủ để giải trình tự nucleotide bằng phương pháp Sanger. Kết quả giải trình tự và so sánh với trình tự tham chiếu trên NCBI được thể hiện trong Hình 5.



Hình 5. Kết quả giải trình tự đoạn gen (C. đoạn gen CbA3; D. đoạn gen CbB3; Query. trình tự giải trình tự plasmid tương ứng; Sbjct. trình tự đoạn gen tham chiếu trên thư viện gen NCBI)

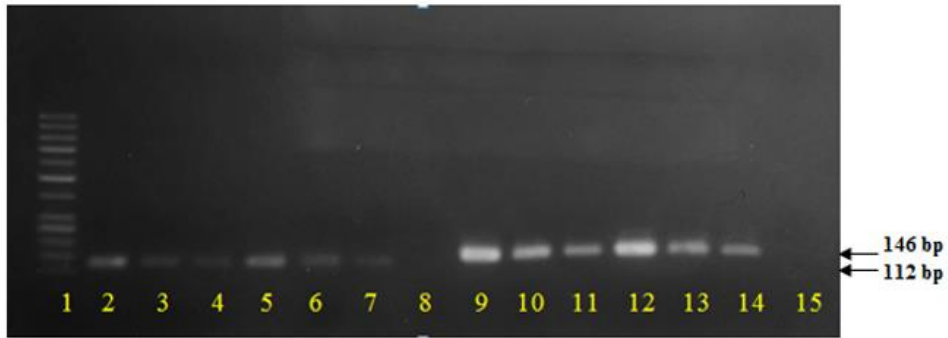
Kết quả giải trình tự đoạn gen cho thấy sự trùng khớp cao (> 99,9%), điều này đảm bảo rằng trình tự đoạn gen được biến nạp vào các plasmid là các trình tự đích CbA3 và CbB3 mà nhóm nghiên cứu đặt ra.

Nhóm nghiên cứu thực hiện so sánh giữa thử nghiệm PCR sử dụng DNA tổng số tách chiết từ vi khuẩn *C. botulinum* mang gen BoNT type A và BoNT type B và plasmid đã được biến nạp gen. Kết quả so sánh giữa các sản phẩm PCR được thể hiện trong Hình 6.

Kết quả ở Hình 6 cho thấy băng DNA của sản phẩm PCR cho kết quả tương đương giữa DNA tổng số ở nồng độ gốc (10^0) và plasmid được biến nạp đoạn gen đặc hiệu ở nồng độ 10^8 – với plasmid CbA3, CbB3. Kết quả này chứng tỏ việc sử dụng plasmid làm đối chứng dương có thể cho hiệu quả tương tự với việc sử dụng DNA tổng số tách chiết từ dịch tăng sinh vi khuẩn *C. botulinum*.

3.4. Xác định các thông số của nguyên liệu chứng dương – Plasmid mang đoạn gen BoNT type A và Plasmid mang đoạn gen BoNT type B bằng PCR

Nhóm nghiên cứu thực hiện xác định các thông số thẩm định theo CAC/GL 74-2010 [14], thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học & vi sinh vật [13], các thông số cần tiến hành xác định bao gồm: Giới hạn phát hiện, độ chính xác, độ nhạy và độ đặc hiệu.

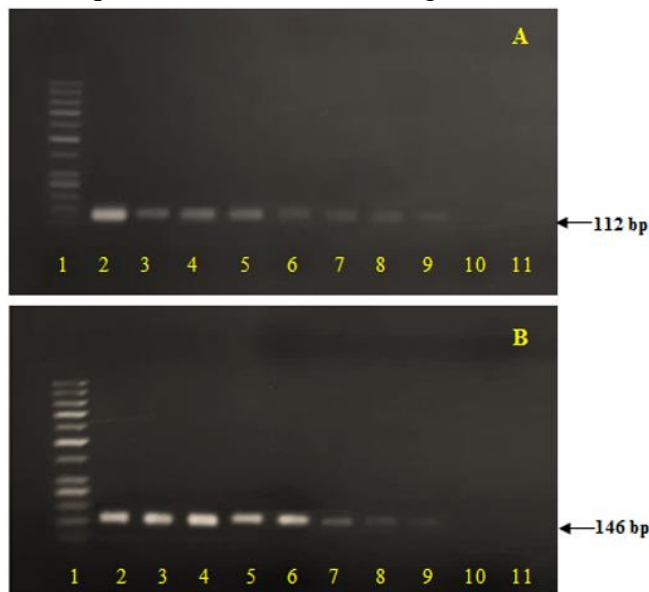


Hình 6. Kết quả so sánh với mẫu DNA tổng số

Giếng: 1: DNA ladder 50bp; 2-8 (sản phẩm PCR của đoạn gen CbA3) 2: DNA tổng số (10^0); 3: DNA tổng số (10^{-2}); 4: DNA tổng số (10^{-4}); 5: Plasmid CbA3 (10^8 copies/ μ L); 6: Plasmid CbA3 (10^6 copies/ μ L); 7: Plasmid CbA3 (10^4 copies/ μ L); 8. Đối chứng âm; 9-15 (sản phẩm PCR của đoạn gen CbB3) 9: DNA tổng số (10^0); 10: DNA tổng số (10^{-2}); 11: DNA tổng số (10^{-4}); 12: Plasmid CbB3 (10^8 copies/ μ L); 13: Plasmid CbB3 (10^6 copies/ μ L); 14: Plasmid CbB3 (10^4 copies/ μ L)

3.4.1. Xác định giới hạn phát hiện của phương pháp thử

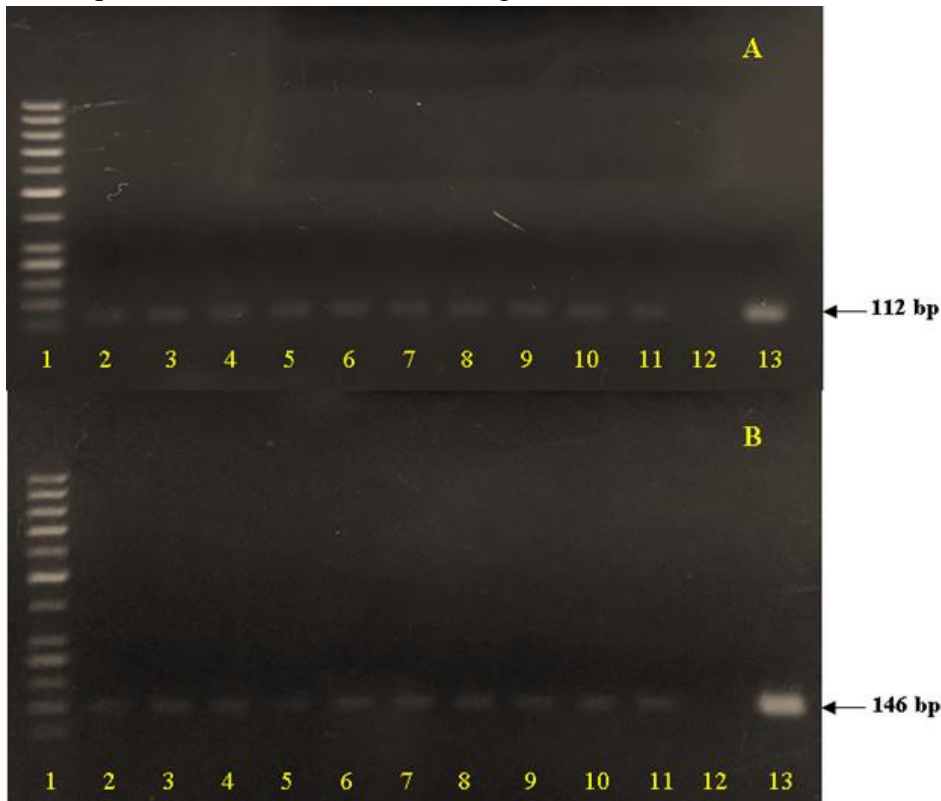
Giới hạn phát hiện của phương pháp (LOD) được tính theo nồng độ DNA thấp nhất trong mẫu, tại đó có tối thiểu 90% mẫu cho kết quả dương tính. Để xác định LOD, DNA từ 1 μ L DNA có số lượng bản copy khác nhau: 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 copies/ μ L được dùng làm khuôn trong phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu nhân gen BoNT type A và type B. Kết quả thu được thể hiện trong Hình 7.



Hình 7. Kết quả khảo sát giới hạn phát hiện của phương pháp PCR với các nồng độ plasmid khác nhau của plasmid CbA3 và CbB3 (10^1 - 10^9 copies/ μ L) (A. plasmid CbA3 - B. plasmid CbB3. Giếng: 1: DNA ladder 50bp; 2: 10^9 copies/ μ L; 3: 10^8 copies/ μ L; 4: 10^7 copies/ μ L; 5: 10^6 copies/ μ L; 6: 10^5 copies/ μ L; 7: 10^4 copies/ μ L; 8: 10^3 copies/ μ L; 9: 10^2 copies/ μ L; 10: 10^1 copies/ μ L; 11: đối chứng âm).

Kết quả điện di (Hình 7. A, B) cho thấy băng nhân bản DNA đặc hiệu cho gen BoNT type A với kích thước 112 bp và băng nhân bản DNA đặc hiệu cho gen BoNT type B với kích thước 146 bp có độ đậm và sáng giảm dần theo lượng khuôn plasmid, đến giá trị 10^1 copies/ μ L thì không phát hiện được băng trên gel điện di. Như vậy, từ các điều kiện phản ứng mà nhóm nghiên cứu đã thiết lập, chúng tôi xác định được giới hạn phát hiện của phương pháp. Nồng độ plasmid ở mức 10^2 copies/ μ L là nồng độ thấp nhất mà phương pháp thử này có thể phát hiện được sự có mặt của gen BoNT type A và type B.

Để xác nhận giá trị LOD, phản ứng được lặp lại 10 lần tại nồng độ plasmid ở mức 10^2 copies/ μ L, kết quả thu được được thể hiện trong Hình 8.



Hình 8. Kết quả điện di trong 10 lần lặp lại phản ứng PCR, mỗi phản ứng chứa 10^2 copies/ μ L plasmid CbA3 và CbB3

A. plasmid CbA3 B. plasmid CbB3. Giếng: 1: DNA ladder 50bp; 2-11: 10^2 copies/ μ L plasmid CbA3 - CbB3; 12: đối chứng âm; 13: đối chứng dương

Kết quả lặp lại 10 lần thử nghiệm ở nồng độ 10^2 copies/ μ L của đoạn gen BoNT type A và type B cho thấy tỉ lệ phần trăm phát hiện trên băng điện di là 100%. Do đó, giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp là 10^2 copies/ μ L. Kết quả cũng tương đồng với các nghiên cứu trên thế giới, cho khả năng phát hiện gen sinh độc tố thần kinh botulinum type A và type B ở giới hạn phát hiện 10^2 copies/ μ L [5-10].

3.4.2. Độ chính xác (AC), độ đặc hiệu (SP) và độ nhạy (SE)

Để xác định các thông số độ chính xác, độ đặc hiệu và độ nhạy của phương pháp thử, hai nhóm mẫu được đưa vào thử nghiệm PCR:

- Nhóm I – Bảng 1: bao gồm các chủng vi khuẩn *Clostridium botulinum*: vi khuẩn *Clostridium botulinum* type A và type B (mã 671), vi khuẩn *Clostridium botulinum* type B (mã Cb) (chủng *Clostridium botulinum* phân lập từ các vụ ngộ độc đã được định danh bằng kỹ thuật MALDI-TOF hoặc giải trình tự gen).

- Nhóm II – Bảng 1: bao gồm các chủng vi khuẩn không thuộc loài *Clostridium botulinum* hoặc là chủng vi khuẩn *Clostridium botulinum* nhưng không sinh độc tố type A và type B bao gồm: vi khuẩn *Clostridium botulinum* không mang gen sinh độc tố; *Clostridium botulinum* type E (chủng *Clostridium botulinum* phân lập từ các vụ ngộ độc đã được định danh bằng kỹ thuật MALDI-TOF hoặc giải trình tự gen).

Kết quả thử nghiệm PCR của hai nhóm mẫu này được thể hiện chi tiết tại mục 3.2.1. và 3.2.2. Từ đó cho thấy phương pháp phát hiện gen BoNT type A và type B bằng việc sử dụng phương pháp PCR và cặp mồi CbA3, CbB3 đặc hiệu cho gen sinh độc tố botulinum type A và type B lần lượt có độ chính xác (AC), độ đặc hiệu (SP) và độ nhạy (SE) có giá trị đều đạt 100%.

3.5. Kết quả thực nghiệm phát hiện gen sinh độc tố botulinum type A và type B trên nền mẫu thực phẩm bằng PCR

Nhóm nghiên cứu tiến hành thử nghiệm phát hiện gen sinh độc tố botulinum type A và type B trên nền mẫu thực phẩm bằng cách tạo các mẫu giả định có bổ sung các plasmid CbA3 và CbB3. Các mẫu thực phẩm đóng hộp là nhóm thực phẩm được công bố trong các nghiên cứu rằng có khả năng cao bị nhiễm vi khuẩn *C. botulinum*, các mẫu được bổ sung thêm plasmid ở nồng độ 10^8 copies/ μ L. Kết quả được thể hiện trong Hình 9.



Hình 9. Kết quả PCR trên mẫu giả định (Giếng: 1-5 (plasmid CbA3) 1. đối chứng dương; 2. nền mẫu thịt hộp; 3. nền mẫu cá hộp; 4. nền mẫu rau củ đóng hộp; 5. đối chứng âm; 6. DNA ladder 50bp; 7-11 (plasmid CbB3) 7. đối chứng dương; 8. nền mẫu thịt hộp; 9. nền mẫu cá hộp; 10. nền mẫu rau củ đóng hộp; 11. đối chứng âm)

Kết quả trên đã một phần cho thấy rằng việc sử dụng quy trình xử lý mẫu thực phẩm và sử dụng kỹ thuật PCR với các cặp mồi đặc hiệu có thể cho phép phát hiện được sự có mặt của vi khuẩn *Clostridium botulinum* mang gen BoNT type A và BoNT type B trong mẫu thực phẩm – đồ đóng hộp đã qua xử lý nhiệt.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tạo được nguyên liệu chứng dương plasmid CbA3 và CbB3 ứng dụng thành công trong thử nghiệm PCR nhằm phát hiện gen sinh độc tố thần kinh botulinum type A và type B. Phương pháp phát hiện gen sinh độc tố thần kinh botulinum type A và type B được thẩm định với các thông số độ chính xác, độ đặc hiệu, độ nhạy đều đạt 100% và giới hạn phát hiện của phương pháp ở mức 10^2 copies/ μ L.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia, đề tài mã số NIFC.ĐTCS.2022.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. J. Sobel and C. Lúquez, “Clostridium botulinum,” *Foodborne Infections and Intoxications*, pp. 405–416, Jan. 2021, doi: 10.1016/B978-0-12-819519-2.00001-3.
- [2]. T. Delle Chiaie, “What is botulinum toxin,” *Essentials of Neuromodulation*, pp. 17–27, Jan. 2021, doi: 10.1016/B978-0-323-89920-8.00006-0.
- [3]. R. K. Dhaked, M. K. Singh, P. Singh, and P. Gupta, “Botulinum toxin: Bioweapon & magic drug,” *Indian J Med Res*, vol. 132, no. 5, p. 489, Nov. 2010, Accessed: May 30, 2022. [Online]. Available: /pmc/articles/PMC3028942.
- [4]. S. Fleck-Derderian *et al.*, “The Epidemiology of Foodborne Botulism Outbreaks: A Systematic Review,” *Clin Infect Dis*, vol. 66, no. suppl_1, pp. S73–S81, Dec. 2017, doi: 10.1093/CID/CIX846.
- [5]. R. J. Hobbs, C. A. Thomas, J. Halliwell, and C. D. Gwenin, “Rapid Detection of Botulinum Neurotoxins-A Review,” *Toxins*, vol. 11, no. 7. NLM (Medline), Jul. 17, 2019. doi: 10.3390/toxins11070418.
- [6]. K. I. Berns *et al.*, “Botulinum Neurotoxin Detection Methods for Public Health Response and Surveillance,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* / www.frontiersin.org, vol. 1, p. 80, 2018, doi: 10.3389/fbioe.2018.00080.
- [7]. T. Binz, H. Kurazonosli, M. Wille, J. Frevertll, K. Wernars, and H. Niemann, “The Complete Sequence of Botulinum Neurotoxin Type A and Comparison with Other Clostridial Neurotoxins*,” *J Biol Chem*, vol. 265, no. 16, pp. 9153–9158, 1990, doi: 10.1016/S0021-9258(19)38824-6.
- [8]. M. Lindström, R. Keto, A. Markkula, M. Nevas, S. Hielm, and H. Korkeala, “Multiplex PCR Assay for Detection and Identification of Clostridium botulinum Types A, B, E, and F in Food and Fecal Material,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 67, no. 12, pp. 5694–5699, Dec. 2001, doi: 10.1128/AEM.67.12.5694-5699.2001.
- [9]. L. Fenicia, F. Anniballi, D. De Medici, E. Delibato, and P. Aureli, “SYBR green real-time PCR method to detect Clostridium botulinum type A,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 73, no. 9, pp. 2891–2896, May 2007, doi: 10.1128/AEM.02234-06.
- [10]. S. Y. Yoon, G. T. Chung, D. H. Kang, C. Ryu, C. K. Yoo, and W. K. Seong, “Application of real-time PCR for quantitative detection of Clostridium botulinum type A toxin gene in food,” *Microbiol Immunol*, vol. 49, no. 6, pp. 505–511, 2005, doi: 10.1111/J.1348-0421.2005.TB03755.X.

- [11]. FDA, "BAM Chapter 17: Clostridium botulinum." Accessed: Jul. 05, 2022. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-17-clostridium-botulinum>.
- [12]. Directorate for standards, metrology and quality, "Microbiology of food - Detection of botulinal neurotoxins A, B, E and F," 2015.
- [13]. T. C. Son, Method validation in chemical and microbiological analysis, Science and Technics Publishing House, 2010 (in Vietnamese).
- [14]. Codex Alimentarius Commission, "Guidelines on performance criteria and validation of methods for detection, identification and quantification of specific DNA sequences and specific proteins in foods," pp. 74, 2010.