

Thiết lập quy trình xử lý mẫu mật ong để thu nhận ADN trực tiếp cho việc phát hiện nhanh *Clostridium botulinum* typ B

Trần Thị Minh Nguyệt¹, Bùi Thị Thanh Thảo², Jordan Duy Nguyễn³,

Tăng Thị Nga⁴, Nguyễn Thùy Trâm⁴, Phạm Bảo Yên^{1*}

¹Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein,

Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

²Khoa Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

³Trường Khoa học sự sống, Đại học California tại San Diego, La Jolla, Hoa Kỳ

⁴Phòng Vi khuẩn kỵ khí, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, Hà Nội, Việt Nam

(Ngày đến tòa soạn: 12/09/2022; Ngày chấp nhận đăng: 04/10/2022)

Tóm tắt

Mật ong là thực phẩm có nguy cơ nhiễm *Clostridium botulinum* gây ra bệnh ngộ độc thịt. Xét nghiệm phát hiện nhanh vi khuẩn này đóng vai trò quan trọng trong việc đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm và giám sát tình hình ngộ độc thực phẩm. Do vi khuẩn có khả năng tồn tại ở dạng bào tử với mật độ thấp, các phương pháp phát hiện phải bắt đầu với việc nuôi cấy tăng sinh vi khuẩn trước khi tiến hành xét nghiệm. Điều này yêu cầu thời gian dài, quy trình chuẩn bị phức tạp, và có khả năng bỏ sót vi khuẩn do không có môi trường chọn lọc thích hợp. Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu là thiết lập được phương pháp phát hiện nhanh *Clostridium botulinum* typ B trực tiếp từ mật ong không qua nuôi cấy bằng cách thu nhận ADN tổng số dùng làm khuôn cho phản ứng khuếch đại đoạn gene mã hóa độc tố thần kinh botulinum BoNT/B. Với 6 mẫu mật ong cung cấp bởi Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương đã cho kết quả dương tính bằng PCR từ khuẩn lạc sau khi tăng sinh, ba phương pháp thu nhận ADN sử dụng kit tách chiết Exgene, sốc nhiệt và vi hạt đều cho tín hiệu khuếch đại. Hơn nữa, khi kết hợp với kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt qua vòng lặp LAMP, tổng thời gian xét nghiệm có thể được rút ngắn xuống dưới 2 giờ từ khi nhận mẫu. Ngoài ra, chúng tôi nhận thấy hiện tượng ức chế phản ứng PCR bởi nền mẫu mật ong và khuyến nghị cần pha loãng ADN từ 5-10 lần. Bên cạnh ưu điểm về mặt thời gian và quy trình đơn giản, phương pháp thu nhận ADN trực tiếp từ mẫu mật ong còn có tính cơ động cao, có thể thực hiện ngay tại hiện trường.

Từ khóa: tách chiết ADN, LAMP, *Clostridium botulinum*, độc tố thần kinh, mật ong.

*Điện thoại: 0982408770

Email: cinaus@gmail.com

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh ngộ độc thịt gây ra bởi độc tố thần kinh botulinum do vi khuẩn *Clostridium botulinum* tạo ra có triệu chứng dễ nhầm lẫn với một số hội chứng thần kinh hay bệnh đột quỵ [1]. Nếu không được chẩn đoán chính xác kịp thời, bệnh nhân có nguy cơ tử vong cao, chỉ trong vòng 48 giờ, do độc tố tác động nhanh tới hệ thần kinh trung ương dẫn đến liệt cơ vận động. Phương pháp thử nghiệm trên chuột sống được coi là tiêu chuẩn với ưu điểm cho kết quả dễ nhận biết, tuy nhiên, không thể tiến hành trong điều kiện tại hiện trường và do yêu cầu nghiêm ngặt về kỹ thuật cũng như đạo đức, đang dần được thay thế bằng các phương pháp sinh học phân tử [2]. Dựa trên ADN của vi khuẩn, các phản ứng khuếch đại chuỗi polymerase (PCR) hay đẳng nhiệt qua vòng lặp (LAMP, [3]) có thể cho kết quả chỉ trong 30 phút tới vài giờ, nhanh, an toàn và khả thi hơn so với phương pháp nuôi cấy thường quy. Vấn đề được quan tâm đối với các phương pháp khuếch đại này là thời gian chuẩn bị và chất lượng ADN sử dụng làm khuôn. Nền mẫu chứa *C. botulinum* thường là thực phẩm giàu dinh dưỡng hay đất nhiễm bào tử, với số lượng tế bào hiện diện ít, khó tách chiết và chứa nhiều thành phần có khả năng ức chế phản ứng PCR. Nền mẫu trong nghiên cứu, mật ong, đã được khẳng định về nguy cơ nhiễm bào tử *C. botulinum* [4]. Quy trình nuôi cấy tăng sinh tiêu chuẩn đối với nền mẫu này có khả năng thất bại, cho kết quả âm tính giả do hàm lượng đường cao, ức chế sự phát triển của vi khuẩn [5]. Vì vậy, nghiên cứu đặt ra mục tiêu là thiết lập được quy trình chuẩn bị ADN đầu vào trực tiếp từ mẫu mật ong tại hiện trường để phục vụ cho việc phát hiện đoạn gene mã hóa độc tố trong vòng 1 giờ khi kết hợp với phương pháp LAMP, hỗ trợ chẩn đoán tại chỗ và tầm soát nguy cơ nhiễm khuẩn.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

6 mẫu mật ong thu thập bởi Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, được bảo quản ở nhiệt độ phòng đã có kết quả nuôi cấy và khẳng định bằng PCR.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết ADN tổng số

2.2.1.1. Phương pháp tách ADN bằng Exgene Soil Mini kit (GeneAll, Hàn Quốc)

500 μ L mật ong được bổ sung thêm 550 μ L đệm ly giải cùng với hạt power beads và vortex ở tốc độ cao nhất theo thang điều chỉnh tốc độ trong 10 phút, sau đó toàn bộ dung dịch được ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng để thu dịch nổi. Dịch nổi chứa ADN được đưa lên cột có gắn màng silica, qua bước rửa cột và hoà tan trong 30 μ L dung dịch EB.

2.2.1.2. Phương pháp đông tan (ký hiệu là FT)

300 μ L mật ong (gồm 100 μ L mẫu mật ong gốc đã hoà tan vào 200 μ L nước để giảm độ nhớt) được làm đông nhanh với nitơ lỏng trong 1 phút, sau đó chuyển vào bể ổn nhiệt ở 100°C trong 1 phút. Quá trình sốc nhiệt được thực hiện 5 lần. Toàn bộ dung dịch được ly

tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng để thu dịch nổi. 2 μ L được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR hoặc LAMP [6].

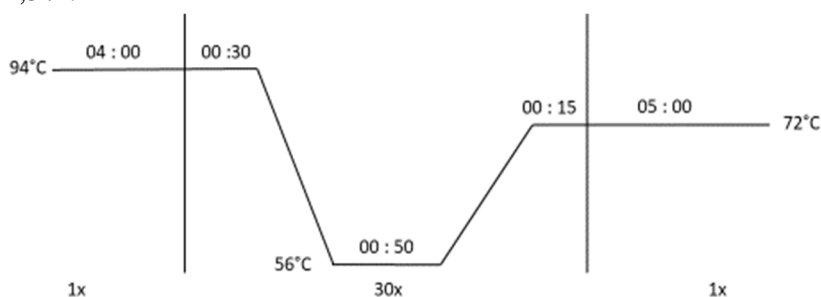
2.2.1.3. Phương pháp phá vỡ tế bào bởi máy đánh hạt silica (ký hiệu là vi hạt B)

300 μ L mật ong (đã được pha loãng 3 lần) được bổ sung 0,15 g hạt silica có kích thước hạt 0,1 mm và thực hiện một lần chu trình sốc nhiệt với nito lỏng và bể ổn nhiệt như đã mô tả ở mục 1.2 [7]. Toàn bộ mẫu sau đó được vortex ở tốc độ cao nhất theo thang điều chỉnh tốc độ, xấp xỉ 4.500 vòng/phút trong vòng 5 phút rồi ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng để thu dịch nổi. 2 μ L được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR hoặc LAMP

2.2.2. PCR

Mẫu mật ong sau khi tách chiết được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymerase (PCR) và chu trình nhiệt đã được nhóm nghiên cứu tối ưu qua nhiều lần khảo sát (Hình 1). Theo tính toán lý thuyết, đoạn gen đích có kích thước 240 bp dựa trên trình tự cặp mồi được thiết kế theo phần mềm LAMP Designer (Optigene, Anh).

Hỗn hợp thành phần phản ứng PCR với tổng thể tích 10 μ L gồm 5 μ L Mastermix 2x (Thermo scientific, Mỹ); 0,4 μ L cho mỗi cặp mồi đặc hiệu *bontB/F3*, *bontB/B3* nồng độ 10 μ M [8]; 2,2 μ L H₂O; 2 μ L ADN khuôn được trộn đều rồi đặt vào máy PCR và tiến hành chạy theo chu trình nhiệt đã thiết lập. Sản phẩm phản ứng sau đó được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5%.



Hình 1. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR sử dụng cặp mồi *bont/B*

2.2.3. Điện di

Sau khi kết thúc phản ứng PCR, 5 μ L sản phẩm được trộn đều với 1 μ L đệm nạp mẫu 6X, tra trên giếng gel agarose 1,5% (đã được bổ sung thuốc nhuộm Red safe (Intron Biology, Hàn Quốc)) và chạy trong đệm TAE 1x (Biobasic, Canada).

Thang chuẩn ADN 1 Kb (Thermo Scientific, Mỹ) được điện di song song cùng với mẫu. Bản gel chứa các băng được quan sát trên máy soi gel.

2.2.4. LAMP

Mẫu mật ong sau khi tách chiết được khuếch đại bằng phản ứng đẳng nhiệt LAMP với bộ 6 mồi đặc hiệu ở 63°C trong 30 phút. Trình tự các mồi được thể hiện dưới Bảng 1.

Thành phần hỗn hợp phản ứng LAMP được sử dụng như hướng dẫn của nhà sản xuất (Optigene, Anh) được trộn đều rồi đặt vào máy Genie III và tiến hành chạy theo chu trình

nhệt đã được nhóm nghiên cứu tối ưu qua nhiều lần khảo sát. Kết quả khuếch đại được thu nhận và phân tích bằng phần mềm Genie Explorer.

Bảng 1. Trình tự bộ 6 mồi *bontB* [8]

<i>bontB/F3</i>	GCCAGTTTTAAATGAAAATGAGAC
<i>bontB/B3</i>	CTACTTTAATGCCATATAATCCATG
<i>bontB/FIP</i>	CGCTTACATATTCTGGTTTTAATCATTTTGCATCAAGGGA
<i>bontB/BIP</i>	TGTTCAAGAAAACAAAGGCGCAATTTTTAAGTTCATGCATTAATA TCAAGGC
<i>bontB/LF</i>	GCATTATACCCCGAAGCCT
<i>bontB/LB</i>	GTATATTTAATAGACGTGGATAT

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Thu nhận ADN tổng số từ mẫu mật ong

6 mẫu mật ong thu thập bởi Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương ký hiệu từ H1 đến H6, được bảo quản ở nhiệt độ phòng đã có kết quả nuôi cấy và khẳng định bằng phương pháp PCR được tách chiết bằng ba phương pháp để thu nhận ADN tổng số.

Bảng 2. So sánh các phương pháp thu nhận ADN trực tiếp từ mẫu mật ong

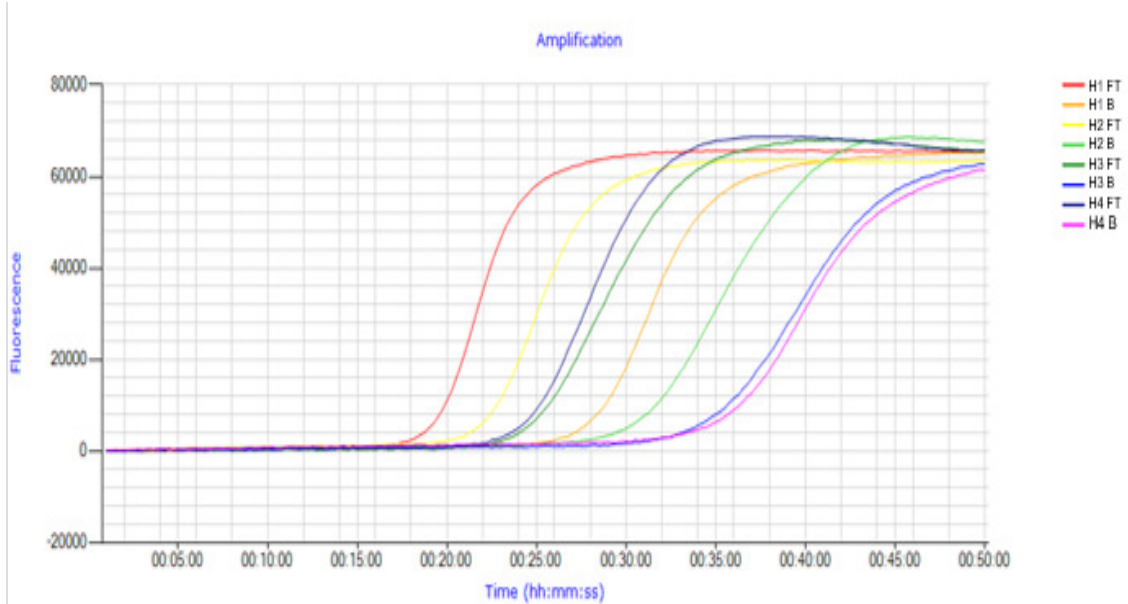
<i>Phương pháp tách ADN tổng số</i>	<i>Thời gian thực hiện</i>	<i>Ưu điểm</i>	<i>Nhược điểm</i>
<i>Phương pháp tách ADN từ Exgene Soil Mini kit</i>	40 phút/ mẫu	Loại bỏ được tạp chất và chất có khả năng ức chế PCR	Đòi hỏi hoá chất, vật tư trang thiết bị, thời gian dài
<i>Phương pháp FT</i>	20 phút/ mẫu	Nhanh Dễ thực hiện Chi phí thấp Tính cơ động cao	Không loại bỏ tạp chất
<i>Phương pháp vi hạt B</i>	20 phút/ mẫu	Nhanh Dễ thực hiện Cơ động	Cần máy móc, hoá chất phù hợp, không loại bỏ tạp chất

Theo quy trình tách chiết của nhà sản xuất Kit Exgene, để hoàn thành một mẫu cần ít nhất 40 phút, gấp đôi so với hai phương pháp còn lại. Ưu điểm lớn nhất của sử dụng kit là giúp cô đặc ADN và góp phần loại bỏ tạp chất có khả năng ức chế PCR. Trong kit có các bước sử dụng RNAase để loại bỏ ARN và bước kết tủa loại bỏ xác tế bào, protein, chỉ giữ ADN hòa tan trong dung dịch, sau đó có bước rửa, cuối cùng mới gắn lên màng trên cột và đẩy với đệm hòa tan ADN, đảm bảo độ tinh sạch của mẫu ADN sau khi tách chiết. Phương

pháp sốc nhiệt sử dụng chu trình đông-tan FT có chi phí thấp nhất do không đòi hỏi hóa chất, máy móc chuyên dụng, tính cơ động cao do các thế hệ máy ly tâm hiện nay (spin) với kích thước nhỏ có thể đạt tới tốc độ theo quy trình và vận chuyển dễ dàng tới địa điểm lấy mẫu. Tuy vậy, có nhược điểm là không loại bỏ tạp chất trong mẫu.

3.2. Kết quả khuếch đại ADN từ mẫu mật ong bằng phương pháp LAMP

Mẫu sau khi tách chiết được kiểm tra bằng phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt LAMP. Kết quả thu được như ở Hình 2.



A

Mẫu	Thời gian ghi nhận tín hiệu	
	Phương pháp FT	Phương pháp B
H1	20'45	30'30
H2	24'15	34'15
H3	27'15	38'45
H4	26'30	39'00
H5	19'15	26'00
H6	18'30	14'45

B

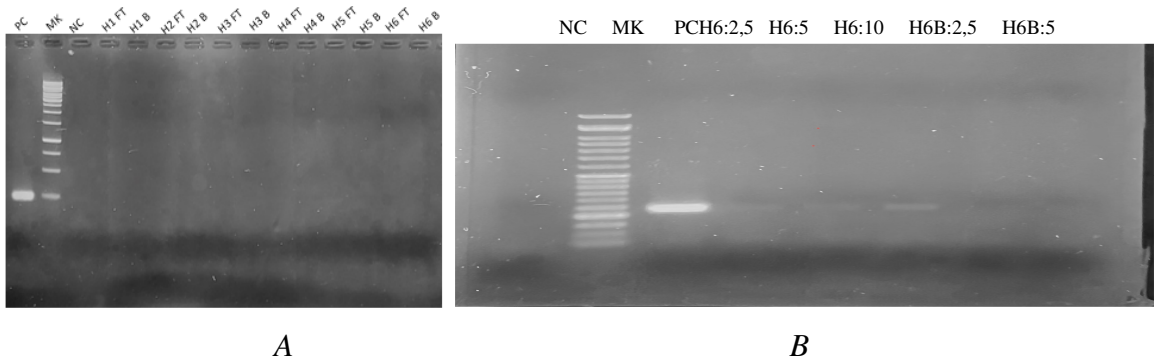
Hình 2. Kết quả LAMP với các mẫu thu nhận ADN bằng phương pháp FT và vi hạt B. A: Đường khuếch đại trên thiết bị LAMP. B: Thời gian ghi nhận đỉnh tín hiệu (phút'giây)

6 mẫu mật ong ký hiệu từ H1 đến H6 được tách chiết bằng hai phương pháp đông tan và phương pháp phá vỡ tế bào bởi máy đánh hạt silica, khuếch đại bằng phản ứng đẳng nhiệt LAMP đều cho kết quả dương tính với *C. botulinum* type B trong thời gian dưới 60 phút. Thời gian nằm trong khoảng tương tự như nghiên cứu sử dụng cặp mồi khuếch đại đoạn gene *ntnh* [9]. Trên thế giới, typ A và B là hai loại phổ biến nhất được phát hiện ở các ca ngộ độc thịt ở trẻ sơ sinh có liên hệ tới mật ong, trong khi type E và F hiếm gặp hơn [10].

Tuy nhiên, mẫu được tách bằng phương pháp đông tan đa số có thời gian ghi nhận tín hiệu sớm hơn ~10 phút so với mẫu được tách bằng phương pháp phá vỡ tế bào bởi máy đánh hạt silica. Các hạt silica trong mẫu khi di chuyển với tốc độ cao gặp phải tế bào vi khuẩn sẽ phá vỡ cấu trúc màng, giúp giải phóng ADN. Phương pháp sốc nhiệt không sử dụng hạt silica này mà chỉ dựa vào việc thay đổi nhiệt độ đột ngột để phá vỡ tế bào đã cho kết quả LAMP sớm hơn, như vậy, có thể nhận thấy việc bổ sung hạt giải phóng được lượng ADN ít hơn. Bước đầu có thể kết luận mẫu mật ong được tách chiết bằng phương pháp đông tan có hiệu quả cao hơn phương pháp phá vỡ tế bào bởi máy đánh hạt silica.

3.3. Sự ức chế của nền mẫu mật ong tới phản ứng PCR

Mẫu mật ong sau tách chiết bằng hai phương pháp đông tan và phương pháp phá vỡ tế bào bởi máy đánh hạt silica được khuếch đại bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu *bontB/F3*, *bontB/B3*. Kết quả thu được (Hình 3A) cho thấy tất cả các mẫu không xuất hiện đoạn băng đích mong muốn. Điều này có thể do có hiện tượng ức chế phản ứng PCR bởi nền mẫu mật ong. Vì vậy, chúng tôi đã thực hiện thí nghiệm pha loãng ADN từ 2,5-5-10 lần (Hình 3B).



Hình 3. Kết quả PCR mẫu mật ong tách chiết DNA tổng số bằng hai phương pháp FT và B. A: Kết quả trước khi pha loãng. PC: mẫu đối chứng dương; NC: mẫu đối chứng âm; MK: thang chuẩn ADN). B. Kết quả PCR mẫu H6 xử lý với phương pháp đông tan (H6) hoặc vi hạt (H6B) được pha loãng theo tỉ lệ 2,5, 5, 10 lần

Nhóm nghiên cứu đã chọn ngẫu nhiên mẫu H6 để thực hiện thí nghiệm pha loãng ADN theo tỉ lệ 2,5, 5, 10 lần. Kết quả nhận thấy mẫu được pha loãng theo tỉ lệ 10 lần cho băng đích đúng kích thước dự kiến xấp xỉ 240 bp sáng, rõ nét hơn so với mẫu còn lại và độ sáng của băng tỉ lệ thuận với hệ số pha loãng mẫu ADN (Hình 3B, giống H6:2,5 đến H6:10). Như vậy, trong nền mẫu mật ong có thể tồn tại chất gây ức chế phản ứng PCR và được giảm đi một phần khi pha loãng. Mẫu được xử lý bằng phương pháp vi hạt không xuất hiện tín hiệu

khuếch đại dù đã pha loãng (Hình 3B, giếng H6B). Theo kết quả ở Hình 3B, khi sử dụng cùng phương pháp sốc nhiệt ký hiệu FT, chỉ với thao tác pha loãng mẫu đã cho băng đậm nét hơn dù theo lý thuyết lượng ADN cũng giảm đi, đây là dấu hiệu của việc có mặt chất ức chế phản ứng PCR có thể đã được giảm đi qua pha loãng. Đối với phương pháp vi hạt B, bên cạnh sự có mặt của chất ức chế, lý do chính là ADN thu nhận được không đủ để thấy băng khuếch đại.

Như vậy, các chất ức chế có bản chất khác nhau cần có phương pháp xử lý phù hợp [11]. Đối với nền mẫu mật ong, chu trình sốc nhiệt phối hợp với việc pha loãng mẫu có thể hiệu quả đối với việc giảm độ nhớt và ảnh hưởng của các đường fructose, glucose.

4. KẾT LUẬN

Quy trình xử lý mẫu mật ong bằng phương pháp sốc nhiệt lặp lại các bước đông-tan kết hợp với phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt LAMP cho phép phát hiện gene mã hóa độc tố của vi khuẩn *C. botulinum* trong vòng 60 phút và có thể tiến hành tại hiện trường.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện trong khuôn khổ đề tài mã số 02/2021/ĐX do Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Việt Nam tài trợ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. M.R. Popoff, "Identification of centres of D-botulism infection in bovines," *Selezione Veterinaria*, vol. 27, no.1, pp. 13-14, 1986.
- [2]. N. Thirunavukkarasu, E. Johnson, S. Pillai, D. Hodge, L. Stanker, and Shashi Sharma, "Botulinum Neurotoxin Detection Methods for Public Health Response and Surveillance," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 8, 80, 2018.
- [3]. T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, and T. Hase, "Loop-mediated isothermal amplification of DNA," *Nucleic Acids Research*, vol. 28, no.12: e63, 2000.
- [4]. T. Grenda, M. Grabczak, K. Kwiatek, and A. Bober, "Prevalence of *C. botulinum* and *C. perfringens* Spores in Food Products Available on Polish Market," *Journal of Veterinary Research*, vol. 61, no.3, pp. 287-291, 2017.
- [5]. M. Lindström, and H. Korkeala, "Laboratory diagnostics of botulism," *Clinical Microbiology Review*, vol. 19, no. 2, pp. 298-314, 2006.
- [6]. A. A. E. Kamel, H. B. Ali, A. M. Mohamed, A. A. Amal, E. A. Osama, and A. M. Abdulaziz, "Freeze- and Thaw-Based Procedures for Extracting DNA from Activated Sludge," *Polish Journal of Environmental Studies*, vol 20, no.3, pp.643-648, 2011.
- [7]. F. Shuji, N. Yoshiko, and K. Fumiko, "Optimal Bacterial DNA Isolation Method Using Bead-Beating Technique," *Journal Global*, vol.3, pp.33-37, 2004.

- [8]. T. Sakuma, Y. Kurosaki, Y. Fujinami, T. Takizawa, and J. Yasuda, “Rapid and simple detection of *Clostridium botulinum* types A and B by loop-mediated isothermal amplification,” *Journal Applied Microbiology*, no. 106, vol. 4, pp.1252-1259, 2009.
- [9]. Y. Chen, H. Li, L. Yang, L. Wang, R. Sun, J. Shearer, and F. Sun, “Rapid Detection of *Clostridium botulinum* in Food Using Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP),” *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 18, no.9, 2021.
- [10]. S. S. Arnon, “Infant botulism”. In: “Textbook of Pediatric Infectious Diseases”, 4th Ed, Feigen, R.D., Cherry, J.D. (eds), Saunders, W.B., Philadelphia, pp. 1570-1577, 1998.
- [11]. C. Schrader, A. Schielke, L. Ellerbroek, and R. Johne, “PCR inhibitors - occurrence, properties and removal,” *Journal of Applied Microbiology*, vol. 113, no. 5, pp. 1014-1026, 2012.

Establishment of a rapid direct DNA preparation procedure for the detection of *Clostridium botulinum* serotype B from honey

Minh Nguyet Tran Thi, Thanh Thao Bui Thi, Jordan Duy Nguyen³,

Nga Thi Tang⁴, Thuy Tram Nguyen⁴, Yen Pham^{1*}

¹Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology,

University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam

²Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam

³School of Life Sciences, University of California at San Diego, La Jolla, United States

⁴Anaerobe Unit, National Institute for Hygiene and Epidemiology, Hanoi, Vietnam

Abstract

Honey is at risk of contamination with *Clostridium botulinum* that causes botulism. Rapid detection of the pathogen in honey is important in food safety assurance and food poisoning surveillance. *C. botulinum* is capable of forming spores at low concentration; thus, regular detection methods must begin with an enrichment step before the main procedure. This additional step requires long time, complicated preparation, and might fail due to improper selective media. Therefore, this study aimed to establish a rapid detection procedure for *C. botulinum* serotype B directly from honey without enrichment culture by obtaining total DNA to use as template for the amplification of a fragment from botulinum neurotoxin type B (BoNT/B) encoding gene. Using 6 honey samples provided by the National Institute of Hygiene and Epidemiology with positive PCR results after enrichment, all three DNA extraction methods including Exgene extraction kit, freeze-thaw cycling and bead beating, showed amplification signals. Furthermore, when combined with the isothermal loop-mediated amplification, the total time could be shortened to less than two hours since collection. In addition, we observed PCR inhibition by the honey matrix and recommended dilution of the sample 5-10 times for the reaction. With the advantages of rapid and simple procedure, direct DNA extraction from honey could be used in field.

Keywords: DNA extraction, LAMP, *Clostridium botulinum*, neurotoxin, honey.