NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO DNA-MICROARRAY ĐỂ PHÁT HIỆN VÀ CHẨN ĐOÁN NHANH CÁC TEM BETA-LACTAMASE KHÁNG KHÁNG SINH PHỔ RỘNG NHÓM BETA-LACTAM

**Bùi Văn Ngọc1,2 \*, Nguyễn Hữu Đức3, Nguyễn Đức Thắng4, Nguyễn Công Hiếu4**

*1 Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

*2 Học Viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

*3 Khoa Công nghệ sinh học - Học Viện Nông nghiệp Việt Nam*

*4 Khoa Công nghệ Thực phẩm và Hóa học - Đại học Sao Đỏ*

**TÓM TẮT**

Tính kháng kháng sinh nhóm beta-lactam ở nhiều loài vi khuẩn là do chúng sản sinh các beta-lactamase phổ rộng có nhiệm vụ thủy phân, phá vỡ cấu trúc của kháng sinh. Một trong các beta-lactamase đó là TEM. Do đột biến xảy ra ở một số codon làm thay đổi amino acid trong trung tâm hoạt động của beta lactamase dẫn đến hình thành nhiều biến thể TEM khác nhau kháng lại phổ kháng sinh rộng hơn. Trong nghiên cứu này, DNA-microaray được chế tạo để phát hiện nhanh và chẩn đoán hai biến thể của TEM là TEM-116 và TEM-8 thông qua việc xác định tính đa hình nucleotide đơn (SNP) tại năm vị trí trên trình tự đích *bla*TEM-116 và *bla*TEM-8. Dựa vào quá trình bắt cặp bổ sung hoàn toàn và không hoàn toàn giữa các mẫu dò trên microarray với trình tự đích đã xác định được các vị trí SNP và kết luận nucleotide bị thay thế (đột biến) hay bảo tồn. Trên *bla*TEM-116, các base G và C tại vị trí SNP 82 và 182 được thay thế bằng A và T tạo thành hai codon mới, dẫn đến thay thế amino acid tại hai vị trí tương ứng: Val(82)Ile và Ala(182)Val. Trong khi đó, trên *bla*TEM-8 tại vị trí SNP 162.1 và 236, C và G được thay thế bằng A và A, do vậy cũng hình thành hai codon mới tương ứng với sự thay thế amino acid: Arg(162)Ser và Gly(236)Ser.

*Từ khóa:* Beta-lactamase phổ rộng, *bla*TEM, bắt cặp bổ sung hoàn toàn và không hoàn toàn, cyanine, đa hình nucleotide đơn, DNA-Microarray

**MỞ ĐẦU**

### Một trong những mối nguy hiểm lớn nhất trong quá trình chăm sóc sức khỏe cộng đồng là tính kháng kháng sinh nhóm beta-lactam phổ rộng của một số vi khuẩn gây bệnh thuộc họ *Enterobacteriacae* như *Escherichia coli* ([Melzer *et al.*, 2007](#_ENREF_18); [Schwaber *et al.*, 2006](#_ENREF_25)), *Klebsiella pneumoniae* ([Mohamudha Parveen *et al.*, 2012](#_ENREF_19)), *Pseudomonas aeruginosa* ([Llanes *et al.*, 2013](#_ENREF_16))… Khả năng kháng kháng sinh của các loài này là do chúngsản sinh ra các enzym beta-lactamase phổ rộng (Extended-spectrum beta-lactamase - ESBL) có khả năng thủy phân vòng ß-lactam và phá vỡ cấu trúc của kháng sinh ([Datta *et al.*, 1965](#_ENREF_9); [Nakhaei Moghaddam *et al.*, 2012](#_ENREF_21)). Các beta-lactamase điển hình được biết đến như TEM (Temoniera), SHV (sulphydryl variable), CTX-M (CefoTaXime-Munich) được mã hõa bởi các gen tương ứng là *bla*TEM,*bla*SHV,*bla*CTX-M. Do được truyền qua plasmid nên các beta-lactamase này được tìm thấy trong nhiều loài *Enterobacteriacae* ở nhiều quốc gia trên thế giới ([Bradford, 2001](#_ENREF_4); [Duttaroy *et al.*, 2005](#_ENREF_10); [Leinberger *et al.*, 2010](#_ENREF_15); [Nakhaei Moghaddam *et al.*, 2012](#_ENREF_21); [Woodford *et al.*, 2007](#_ENREF_28)). Thêm vào đó, do đột biến làm thay đổi nucleotide trong một số codon mã hóa cho amino acid thuộc trung tâm hoạt động của enzym, dẫn đến thay đổi thành phần amino acid và tạo ra các biến thể enzym khác nhau có khả năng phá hủy phổ kháng sinh nhóm beta-lactam rộng hơn, không chỉ ampicillin, penicillin, mà còn bao gồm các oxyimino-cephalosporin (ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, cefpodoxime, cefotaxime…)… thậm chí carbapenem. Cho đến nay, có khoảng 140 biến thể của TEM-1, 60 biến thể của SHV-1 và 80 biến thể của CTX-M-1 được tìm thấy. Thêm vào đó, sự tương đồng về trình tự amino acid giữa TEM-1 và SHV-1, giữa TEM-1 và CTX-M lần lượt là 68%, 40% ([Bradford, 2001](#_ENREF_4); [Paterson *et al.*, 2003](#_ENREF_23)). Vì vậy, việc chẩn đoán tính kháng beta-lactam ở một số loài vi khuẩn gây bệnh sinh beta-lactamase phổ rộng nói chung và các biến thể của TEM nói riêng là một trong những chiến lược quan trọng trong điều trị và phòng chống bệnh tật.

### Trước đây, trong phát hiện và chẩn đoán người ta có thể dùng phương pháp vi sinh học lâm sàng, nuôi cấy và quan sát hình thái dưới kính hiển vi ([Katsanis *et al.*, 1994](#_ENREF_14)). Phương pháp này tuy đơn giản, nhưng cần ít nhất 2 ngày và có thể không phân biệt được một số loài dựa vào đặc điểm hình thái. Bên cạnh đó, phương pháp Vitek ESBL cũng được dùng để phát hiện một số loài vi khuẩn sản sinh nhóm beta-lactamase ([Sanders *et al.*, 1996](#_ENREF_24)), tuy nhiên phương pháp này có độ nhạy thấp. Gần đây, các phương pháp PCR được phát triển như PCR-RFLP ([Arlet *et al.*, 1995](#_ENREF_1)), PCR-SSCP ([M'Zali *et al.*, 1998](#_ENREF_17)) hoặc RT-PCR ([Birkett *et al.*, 2007](#_ENREF_2))… tuy rút ngắn thời gian phát hiện, cũng như tăng độ nhạy và đặc hiệu đáng kể so với các phương pháp trên, nhưng không linh động trong việc phân tích song song, cùng một lúc các biến thể ở nhiều chủng loài hay tính đa hình nucleotide đơn (single nucleotide polymorphism, SNPs). Trong khi đó, DNA-Microarray có khả năng phát hiện nhanh trong khoảng 4 h, đặc biệt chẩn đoán đồng thời các biến thể enzym và tính đa kháng thuốc của nhiều loài trong cùng một lúc ([Cuzon *et al.*, 2012](#_ENREF_8); [Leinberger *et al.*, 2010](#_ENREF_15); [Naas *et al.*, 2011](#_ENREF_20)). Điều đó giúp cho việc điều trị kịp thời và chính xác và tránh lập lại thí nghiệm nhiều lần. Chính vì thế, trong nghiên cứu này, chúng tôi bước đầu nghiên cứu chế tạo DNA-Microarray để phát hiện và chẩn đoán nhanh hai biến thể của TEM-1 là TEM-116 và TEM-8, được tách ra từ *E. coli* và *K. pneumoniae*.

**NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP**

**Nguyên liệu**

Tất cả các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu này đều được mua từ hãng Sigma-Aldrich, Merck, BASF, Invitrogen, New England Biolabs (Đức). Các gen *bla*TEM-1 (J01749), *bla*TEM-116 (U36911) và *bla*TEM-8 (X65252) được tách ra từ hai loài vi khuẩn gây bệnh *E. coli* và *K. pneumoniae*, sau đó được gắn lên plasmid pUC19 (New England Biolabs) và biến nạp vào *E. coli* DH5α (Clontech), cũng như cặp mồi dùng để khuếch đại các gen này đều sẵn có tại nhóm nghiên cứu của TS. Till T. Bachmann thuộc Viện Hóa sinh kỹ thuật (ITB), ĐH Stuttgart, Đức (hiện nay thuộc ĐH Edinburgh - Anh).

**Phương pháp**

***Thiết kế mẫu dò để phát hiện tính đa hình nucleotide đơn (SNPs)***

Trình tự các gen *bla*TEM-1 (J01749), *bla*TEM-116 (U36911) và *bla*TEM-8 (X65252) đã công bố trên ngân hàng gen (NCBI) được so sánh bằng công cụ sắp thẳng hàng đa trình tự (phần mềm BioEdit hoặc CLC Sequence Viewer) để xác định sự khác biệt nucleotide hay tính đa hình nucleotide đơn (SNPs) làm thay đổi amino acid trong trung tâm hoạt động của hai biến thể này (Bảng 1). Nucleotide khác biệt nào dẫn đến sự thay đổi amino acid sẽ được đặt vào vị trí giữa của mẫu dò, trong đó mẫu dò là đoạn oligonucleotide có kích thước từ 17-19 base. Do vậy, để xác định một SNP, cần sử dụng 4 mẫu dò giống nhau về trình tự, nhưng khác nhau ở nucleotide đặt ở vị trí giữa mẫu dò.

**Bảng 1. Trình tự mẫu dò được dùng để phát hiện SNP trong các biến thể của TEM khác nhau**

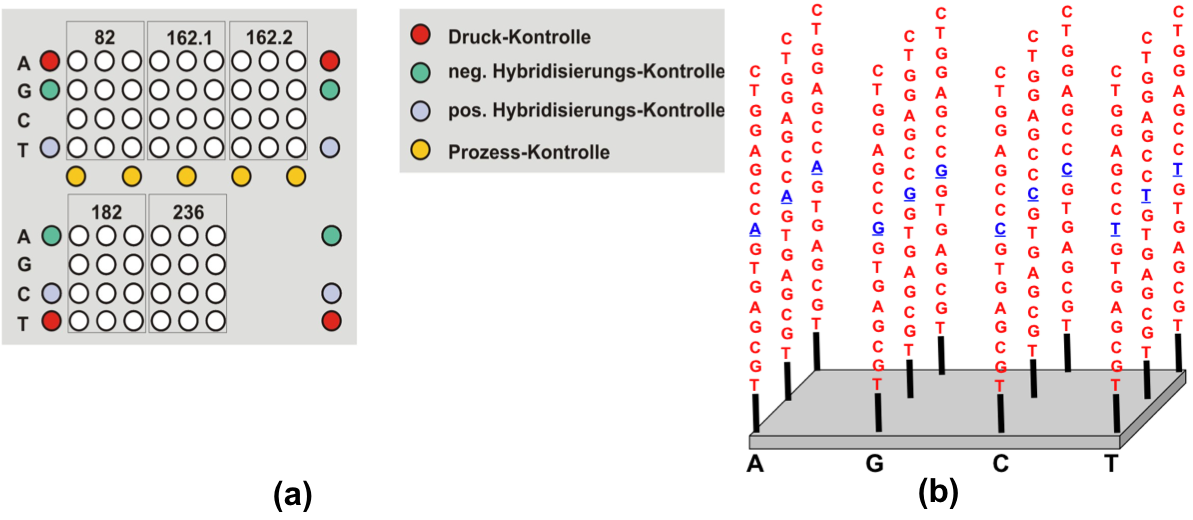
|  |  |
| --- | --- |
| Vị trí codon trên *bla*TEM-1 mã hóa amino acide\* | Trình tự mẫu dò (5’-3’)\*\* |
| 82 (GTT) | TTATCCCGT**NTT**GACGCCG |
| 162.1 (CGT) | GCCTTGAT**NGT**TGGGAA |
| 162.2 (CGT) | GCCTTGAT**CNT**TGGGAA |
| 182 (GCA) | CGATGCCT**GNA**GCAATGGC |
| 236 (GGT) | CTGGAGCC**NGT**GAGCGT |

(\*) Nucleotide biến đổi trong bộ ba mã hóa làm thay đổi amino acid được gạch chân

(\*\*) Mỗi trình tự mẫu dò sẽ tạo thành 4 mẫu dò khác nhau, chúng giống nhau ở trình tự nucleotide, nhưng khác nhau ở vị trí **N** (A, T, G hoặc C), tức tổng số mẫu dò sẽ là 20 trình tự.

***Tạo DNA-Microarray***

Các mẫu dò sau khi thiết kế và đặt mua (Invitrogen, Đức) được sử dụng để phát hiện các SNP (Bảng 1) sẽ được gắn bằng cách dập (printing) hay chấm (spotting) lên bề mặt của phiến kính (glass silde) có kích thước 72x22x1 mm (Nexterion Slide E, Schott, Jena, Đức) bằng robot có 8 ghim (BioRobotics MicroGrid II, Genomic Solutions Ltd., Huntingdon, Anh). Mỗi chấm sẽ được dập 3 lần. Sau khi dập mẫu dò lên bề bặt, toàn bộ phiến kính được ủ tại 60ºC/ 30 min. Sau đó được rửa 3 lần, lần 1 trong nước cất hai lần bổ sung 0,1% Triton X-100/ 5 min, lần 2 trong nước cất hai lần bổ sung 0,05% HCl đậm đặc (37%)/ 4 min, lần 3 trong dung dịch muối KCl 100 mM/ 10 min. Tiếp theo các phiến kính này được ngâm ủ tiếp trong dung dịch chứa 25% ethylen glycol và 0,05% HCl đậm đặc tại 50º C trong 15 min. Các phiến kính tiếp tục được rửa bằng nước cất hai lần trong 1 min, sau đó được làm khô bằng khí nitơ và có thể sử dụng ngay hoặc bảo quản trong điều kiện tối với hạn sử dụng tối đa 20 ngày. Quá trình chấm mẫu dò lên bề mặt của phiến kính được mô ta theo hình 1a và DNA-Microarray được tạo ra để phát hiện một SNP được mô tả như hình 1b. Toàn bộ quá trình này được lặp lại hai lần, do vậy mỗi điểm trên microarray sẽ có 6 giá trị khi đo để lấy giá trị trung bình (Hình 2b).



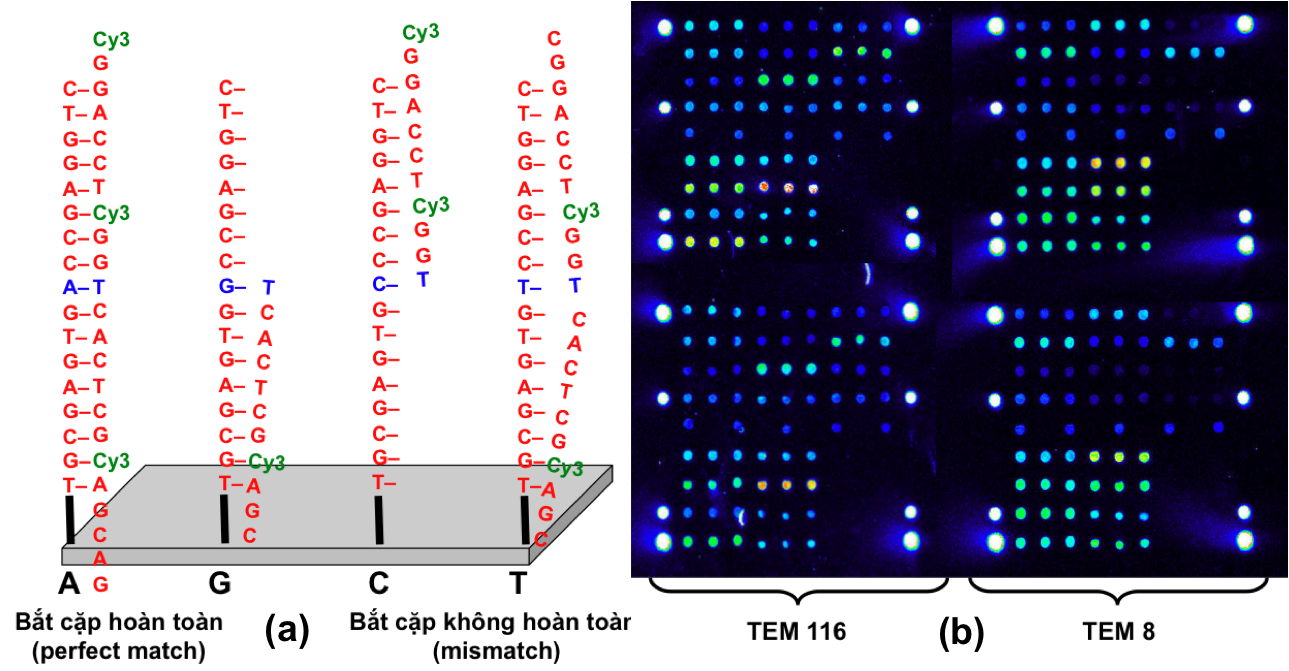
**Hình 1. Cách bố trí vị trí các mẫu dò (a) sẽ được dập trên phiến kính để tạo thành microarray (b)**. Mỗi vị trí SNP cần phát hiện sẽ được dập lặp lại 3 lần và được ghi trên mỗi vị trí SNP tương ứng (a), các base A, G, C, T nằm cột trái ngoài cùng của (a) sẽ nằm tương ứng ở vị trí giữa của trình tự mẫu dò trên (b), (b) minh họa microarray phát hiện SNP tại codon 236 (GGT), trong đó base cần kiểm tra được gạch chân. Druck-Kontrolle: là vị trí trình tự đã được gắn chất nhuộm huỳnh quang để đảm bảo hoạt động của quá trình dập bằng robot; neg. Hybridisierungs-Kontrole: nơi trình tự không bắt cặp với trình tự nào trong quá trình lai; pos. Hybridisierungs-Kontrole: nơi trình tự chắc chắn bắt cặp với trình tự cho trước đã gắn chất nhuộm huỳnh quang trong quá trình lai; prozess-Kontrolle; nơi trình tự bắt cặp với trình tự bảo thủ của *bla*TEM trong quá trình lai. Các trình tự như đã mô tả trên (a) được sử dụng để kiểm tra và đảm bảo độ tin cậy của quá trình chấm mẫu dò lên phiến kính, quá trình lai bắt cặp với các trình tự đã chuẩn bị trước và không liên quan đến trình tự đích cần tìm.

***Chuẩn bị, tinh sạch và xử lý trình tự đích***

Các trình tự đích (phần nguyên liệu) được khuếch đại và đánh dấu bằng chất nhuộm cyanide (Cy3) thông qua PCR, bao gồm các thành phần: 25÷35 ng plasmid; 0,4 µM mồi mỗi loại; đệm 1xPCR chứa 2,5 mM Mg(C2H3O2)2, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 µM dNTPs (dATP, dGTP, dTTP); 30 µM dCTP; 20 µM Cy3-dCTP; 1 U Taq DNA polymerase. Phản ứng được thực hiện tại: 94º C - 1 min; 30 chu kỳ lặp lại (94º C - 30 s, 55º C - 30 s, 72º C - 1 min); 72º C - 4 min (Mastercycler, Eppendorf, Đức). Sản phẩm PCR (kích thước 867 bp) sau khi đánh dấu và tinh sạch (Qiaquick Spin PCR purification kit, Qiagen) sẽ được pha loãng tới nồng độ 30 ng/µL trong dung dịch đệm (40 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM MgSO4, 1 mM CaCl2), sau đó được xử lý bằng enzym DNase I (11,5 mU/µL, Promega, Mannheim, Đức) để phân cắt thành các đoạn oligonucleotide đích có kích thước khác nhau phục vụ cho quá trình lai sau này. Cuối cùng, bổ sung 3 mM EGTA và ủ tại 65º C trong 10 phút để bất hoạt enzym DNase I.

***Lai phân tử***

25÷100 ng các đoạn oligonucleotide đích cộng với 0,05 pmol trình tự bắt cặp trong lai đối chứng dương (Hình 1a, pos. Hybridisierungs-Kontrole) sẽ được lai với các trình tự trên mỗi phiến kính (microarray, Hình 1b) trong 65 µL dung dịch 2xSSPE (0,36 M NaCl; 20 mM NaH2PO4; 2 mM EDTA pH 7,7) có bổ sung thêm 0,1% SDS. Quá trình lai được thực hiện trong tủ lai ổn nhiệt (OV5, Biometra) tại 45º C trong 2 h. Khi quá trình lai kết thúc, các phiến kính sẽ được rửa hai lần ở nhiệt độ phòng: lần 1 trong 2xSSC (0,3 M NaCl và 0,03 M Natri citrate) bổ sung 0,1% SDS trong 1 min; lần 2 trong 0,2xSSC trong 1,5 min. Sau đó, các phiến kính này được làm khô bằng khí nitơ trong 4 min và được đem đi xác định tín hiệu huỳnh quang của Cy3. Quá trình lai được minh họa trên hình 2a.



**Hình 2: Minh họa quá trình lai phân tử tại SNP 236 trên microaray (a) và kết quả thu được sau khi đo tín hiệu huỳnh quang (b)**. Quá trình bắt cặp, bổ sung hoàn toàn và không hoàn toàn giữa các trình tự của mẫu dò trên microaray với các đoạn được đánh dấu bằng Cy3 của trình tự đích cần tìm (a). Sau khi lai và rửa, microarray được quyét bằng chùm sáng trong máy đo để ghi lại cường độ huỳnh quang phát ra tại mỗi điểm (b). Mỗi điểm đo trên hình 2b tương ứng với cách bố trí và thiết kế trên hình 1a.

***Đo cường độ huỳnh quang, tính toán, xử lý và biểu diễn số liệu***

Tín hiệu huỳnh quang phát ra của Cy3 được đo tại hai bước sóng: 550 nm (sóng kích thích) và 570 nm (sóng phát xạ) bằng máy ScanArray Express Microarray Scanner (PerkinElmer, Waltham, MA). Kết quả được ghi lại dưới dạng ảnh (jpg hoặc png, hình 2b) bằng phần mềm ScanArray Express, đồng thời tín hiệu cường độ huỳnh quang được chuyển và truy xuất dưới dạng bảng tính Microsoft Excel. Cường độ tín hiệu huỳnh quang thực tại mỗi điểm được tính bằng cách trừ đi cường độ tín hiệu huỳnh quang của môi trường xung quanh (background). Cường độ tín hiệu thực của một trong bốn vị trí nucleotide (A, G, C hoặc T) tại mỗi vị trí SNP cao nhất sẽ tương ứng với bắt cặp hoàn toàn tại vị trí nucleotide đó (perfect match – PM, hình 2a) và được gọi là IPM, tại ba vị trí nucleotide còn lại có cường độ thấp hơn tương ứng với các cặp bổ sung không hoàn toàn (mismatch – MM, hình 2a) và được gọi là IMM. Vì thế, IPM sẽ luôn có giá trị lớn hơn IMM. Để thuận lợi cho việc xác định PM hay MM tại mỗi vị trí SNP, cường độ tín hiệu của bốn nucleotide tại mỗi vị trí SNP được chuẩn hóa thông qua tỷ số IPM/IPM và IMM/IPM. Do đó, tỷ số IPM/IPM = 1 cũng tương ứng với bắt cặp bổ sung hoàn toàn và tại duy nhất một trong bốn nucleotide (A, G, C hoặc T), trong khi IMM/IPM < 1 tương ứng với bắt cặp không hoàn toàn tại ba vị trí nucleotide còn lại. Kết quả cuối cùng được biểu diễn trên biểu đồ Microsoft Excel sau khi lấy giá trị trung bình tại 6 điểm đo cho mỗi vị trị SNP và độ lệch chuẩn.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

Các biến thể của TEM-beta lactamase được phát hiện thông qua việc xác định tính đa hình nucleotide đơn (SNP) tại một số vị trí trên trình tự đích *bla*TEM dựa vào quá trình lai phân tử và bắt cặp bổ sung giữa các mẫu dò trên microarray với các trình tự đích được đánh dấu bằng chất nhuộm phát huỳnh quang. Sau khi rửa chọn lọc trong dung dịch muối có nồng độ giảm dần sẽ loại bỏ các đoạn không bắt cặp bổ sung, mà còn lại chủ yếu các cặp đã bổ sung hoàn toàn (có cường độ tín hiệu cao nhất, IPM) và bổ sung không hoàn toàn (có cường độ tín hiệu thấp hơn, IMM). Dựa vào việc so sánh cường độ tín hiệu giữa các điểm thông qua tỷ số IPM/IPM và IMM/IPM sẽ xác định được vị trí SNP và kết luận nucleotide bị thay thế (đột biến) hay giữ nguyên (bảo tồn)

Từ kết quả tính toán tỷ số IPM/IPM và IMM/IPM kết hợp so sánh với 5 vị trí SNP cần xác định trên *bla*TEM-1 là 82(GTT), 162.1(CGT), 162.2(CGT), 182(GCA) và 236(GGT) cho thấy:

Đối với *bla*TEM-116 (hình 3, phía trên) tại vị trí SNP 82, base A có cường độ tín hiệu cao nhất so với các base khác là G, C, T. Điều đó có nghĩa quá trình bắt cặp bổ sung giữa mẫu dò và trình tự đích là hoàn toàn tại vị trí base A (nằm ở vị trí giữa trình tự mẫu dò), trong khi đó quá trình bắt cặp bổ sung không hoàn toàn xảy ra tại các vị trí G, C, T. Vì vậy, tại vị trí SNP 82 của *bla*TEM-116 xuất hiện base mới là A. Nói khác đi G trên *bla*TEM-1 được thay bằng A trên *bla*TEM-116, dẫn đến hình thành codon mới là ATT trên *bla*TEM-116 và được viết thành GTT(82)ATT. Trong khi đó, tại SNP 162.1, base C có cường độ tín hiệu cao nhất tương ứng với quá trình lai hoàn toàn tại C và quá trình lai không hoàn toàn tại A, G, T. Do vậy, trên *bla*TEM-116 không xuất hiện base mới tại SNP 162.1 hay codon 162 của *bla*TEM-116 vẫn được bảo tồn là CGT. Giống như SNP 162.1, SNP 162.2(CGT) trên *bla*TEM-116 vẫn được bảo tồn. Tuy nhiên, tại SNP 182 trên *bla*TEM-116 xuất hiện base mới là T. Do đó, base C trên *bla*TEM-1 được thay thế bằng base T trên *bla*TEM-116, tạo thành codon mới là GTA và được viết là GCA(182)GTA. Trái lại, không có sự thay thế base nào xảy ra tại SNP 236 (hình 3, trên). Như vậy, so sánh với các vị trí SNP trên *bla*TEM-1, trên *bla*TEM-116 xuất hiện hai base mới là A và T tại hai vị trí SNP 82 và 182 tạo thành hai codon mới tương ứng với hai vị trí thay thế là GTT(82)ATT và GCA(182)GTA. Sự thay thế này dẫn tới sự thay đổi thành phần amino acid tương ứng là Val(82)Ile và Ala(182)Val và qua đó tạo thành biến thể beta-lactamase mới với tên gọi TEM-116 ([Jeong *et al.*, 2004](#_ENREF_12)).

Theo cách lập luận tương tự như trên và so sánh với các vị trí SNP trên *bla*TEM-1, trên *bla*TEM-8 cũng xuất hiện hai base A mới tại hai vị trí SNP 162.1(AGT) và 236(AGT). Trong khi đó, không tìm thấy sự thay đổi nào tại hai vị trí SNP còn lại là 162.2 và 182 hay các base này vẫn được bảo tồn ở *bla*TEM-8 (hình 3, dưới). Do vậy, tại hai vị trí SNP 162.1 và 236 trên *bla*TEM-1, base C và G được thay thế bằng hai base A tại các vị trí SNP tương ứng trên *bla*TEM-8, hình thành nên 2 codon mới và được viết thành CGT(162.1)AGT và GGT(236)AGT. Sự thay thế này cũng dẫn đến thay đổi của thành phần amino acid tương ứng là Arg(162)Ser và Gly(236)Ser và tạo thành biến thể beta-lactamase mới với tên gọi TEM-8 ([Chanal *et al.*, 1992](#_ENREF_6)).



**Hình 3. So sánh cường độ tín hiệu huỳnh quang tại các base (A, G, T, C) thuộc các vị trí SNP khác nhau trên *bla*TEM-116 (hình trên) và *bla*TEM-8 (hình dưới)**. Cường độ tín hiệu cao nhất của một trong bốn base tại mỗi vị trí SNP gọi là IPM, cường độ tín hiệu tại ba base thấp hơn còn lại gọi là IMM.Chuẩn hóa việc so sánh cường độ tín hiệu giữa các base thông qua tỷ số IPM/IPM và IMM/IPM. Giá trị IPM/IPM = 1 ứng với lai bắt cặp hoàn toàn tại base đó, giá trị IMM/IPM < 1 ứng với lai bắt cặp không hoàn toàn tại các base còn lại.

Hai biến thể TEM-116 và TEM-8 là các beta-lactamase phổ rộng (ESBL) đều bắt nguồn từ TEM-1 ([Datta *et al.*, 1965](#_ENREF_9)) và được tìm thấy nhiều ở *E. coli* và *K. pneumoniae*. Tuy nhiên, khác với TEM-1 chủ yếu kháng penicillins, TEM-116 và TEM-8 có khả năng kháng lại cả amoxicillin, một số thuộc nhóm oxyimino-cephalosporin như cefotaxime, cefpodoxime, ceftazidime và oxyimino-monobactam như aztreonam ([Chanal *et al.*, 1989](#_ENREF_7)). Tính kháng kháng sinh phổ rộng của các biến thể này là do thay đổi một số nucleotide (quá trình đột biến) tại một số codon dẫn đến thay đổi thành phần và cấu hình amino acid trong trung tâm hoạt động của chúng. Chính vì thế, các phương pháp phát hiện và chẩn đoán phân tử đã phát triển với mục đích phát hiện nhanh các biến thể này thông qua việc xác định sự thay đổi về trình tự nucleotide. Một trong đó phải kể đến các phương pháp PCR. Phương pháp PCR thông thường có ưu điểm dễ thao tác, nhưng không phân biệt được beta-lactam phổ rộng hoặc phổ hẹp và các biến thể của TEM, SHV ([Nuesch-Inderbinen *et al.*, 1996](#_ENREF_22)). Trong khi đó, PCR-SSCP có ưu điểm là phân biệt được một số biến thể của beta-lactamase, nhưng cần các điều kiện cho quá trình chạy điện di trên gel agarose phức tạp công phu ([M'Zali *et al.*, 1998](#_ENREF_17)). Bên cạnh đó, phương pháp PCR-RFLP có ưu điểm dễ thao tác hơn và có thể phát hiện sự sai khác nucleotide. Tuy nhiên, sự sai khác nucleotide dẫn đến thay đổi vị trí giới hạn và vì vậy gây khó khăn cho việc phân tích tiếp theo ([Kalai Blagui *et al.*, 2009](#_ENREF_13); [Sharma *et al.*, 2010](#_ENREF_26))… Gần đây, nhờ sự ra đời của DNA-Microarray đã đem lại hiệu quả cao trong việc phát hiện và chẩn đoán, đặc biệt xác định nhiều biến thể có khả năng kháng phổ kháng sinh beta-lactam rộng hơn như các biến thể của TEM ([Grimm *et al.*, 2004](#_ENREF_11)) và của TEM, SHV và CTX-M ([Leinberger *et al.*, 2010](#_ENREF_15)) hoặc các biến thể của OXA ([Stuart *et al.*, 2012](#_ENREF_27))…

Trong nghiên cứu này, DNA-Microarray được chế tạo và sử dụng để xác định các vị trí SNP trên hai biến thể TEM-116 và TEM-8. Bốn vị trí SNP mới tìm được trên hai biến thể này giống bốn vị trí tìm được bằng DNA-Microarray trước đó ([Grimm *et al.*, 2004](#_ENREF_11); [Leinberger *et al.*, 2010](#_ENREF_15)) và cũng tương ứng với bốn vị trí nucleotide bị thay thế trên trình tự *bla*TEM-1 đã công bố ([Chanal *et al.*, 1992](#_ENREF_6); [Jeong *et al.*, 2004](#_ENREF_12)). Ngoài ra, thời gian để phát hiện các biến thể TEM bằng DNA-Microarray sử dụng trong nghiên cứu này và trước đó là tương đương nhau trong khoảng 3,5 đến 4 h. So với các phương pháp PCR (PCR-SSCP, RT-PCR, PCR-RFLP…) ([Bradford, 2001](#_ENREF_4)), phương pháp Vitek ESBL ([Sanders *et al.*, 1996](#_ENREF_24)) hoặc giải trình tự nucleotide ([Bradford, 1999](#_ENREF_3))… thời gian phát hiện của DNA-Microarray như vậy chưa thể hiện hết tính ưu việt của nó nếu như chỉ phát hiện một đối tượng. Tuy nhiên, trong trường hợp phát hiện song song nhiều đối tượng cùng một lúc trong khoảng thời gian không đổi, thì DNA-Microarray đem lại hiệu quả to hớn về mặt thời gian và năng suất phân tích. Bởi lẽ, do quá trình đột biến dẫn đến hình thành các biến thể beta-lactamase phổ rộng của TEM, SHV, CTX-M khác nhau và do được truyền qua plasmid nên các biến thể beta-lactamase này được tìm thấy ở nhiều loài vi khuẩn gây bệnh, lan rộng sang nhiều quốc gia khác nhau ([Bradford, 2001](#_ENREF_4); [Canton *et al.*, 2008](#_ENREF_5); [Nakhaei Moghaddam *et al.*, 2012](#_ENREF_21))… bởi thế cho nên DNA-Microarray đóng vai trò như một trong những công cụ hữu hiệu để phát hiện và chẩn đoán nhanh, song song, đồng thời các biến thể này. Hơn thế nữa, DNA-Microarray còn là công cụ trong giải trình tự và xác định kiểu gen của từng đối tượng phân tích và vì vậy giúp cho việc điều trị kịp thời, chính xác.

**KẾT LUẬN**

DNA-Microarray tạo ra trong nghiên cứu này bước đầu được dùng để phát hiện hai biến thể của TEM-1 là TEM-116 và TEM-8 trong khoảng thời gian 4 h. Việc phát hiện các vị trí SNP mới hay xác định kiểu gen của hai biến thể sẽ là cơ sở để phát triển các loại DNA-Microarray tiếp theo với mục đích phát hiện và chẩn đoán nhanh không những các biến thể TEM khác, mà còn các beta-lactamase phổ rộng hơn như SHV, đặc biệt CTX-M.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Arlet G, Brami G, Decre D, Flippo A, Gaillot O, Lagrange PH(1995) Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM beta-lactamases. *FEMS Microbiol Lett* 134(2)**:** 203-208.

Birkett CI, Ludlam HA, Woodford N, Brown DF, Brown NM, Roberts MT(2007) Real-time TaqMan PCR for rapid detection and typing of genes encoding CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *J Med Microbiol* 56(1)**:** 52-55.

Bradford PA (2001) Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 14(4)**:** 933-951.

(Không sử dụng quá 12 Tài liệu tham khảo)

Production of DNA-microarray for rapid detection and diagnosis of TEM beta-lactamases resistant to extended spectrum beta-lactam antibiotics

**Bui Van Ngoc1,2 [[1]](#footnote-1), Nguyen Huu Duc3, Nguyen Duc Thang4, Nguyen Cong Hieu4**

1 *Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)*

*2 Graduate University of Science and Technology (VAST)*

3 *Faculty of Biotechnology, Hanoi University of Agriculture*

4 *Faculty of Food and Chemistry Technology, Red Star University*

**SUMMARY**

The extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) produced by many bacterial pathogens are resistant to extended-spectrum beta-lactam antibiotics by hydrolyzing the ß-lactam ring and breaking the structure of antibiotics. Of these ESBLs are TEM beta-lactamases. Nucleotide substitutions in some codons lead to amino acid changes that alters configuration of active center of beta-lactamases resulting in formation of many TEM variants resistant to broader spectrum beta-lactam antibiotics. In the present study, DNA-Microarray were fabricated for rapid detection and diagnosis of two TEM variants, namely TEM-116 anf TEM-8, by means of identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) at five positions in *bla*TEM-116 and *bla*TEM-8 target sequences. Based on perfect match and mismatch between oligonucleotide probes on microarray and fragments of target DNA during hybridation, the SNPs were determined and nucleotide substitutions (mutation) or conservation were also elucidated. In the *bla*TEM-116 sequence, bases G and C at SNP positions 82 and 182 were replaced by bases A and T, respectively that leads to amino acid substitutions at Val(82)Ile and Ala(182)Val, respectively. For *bla*TEM-8 gene, two bases C and G at SNP positions 162.1 and 236 were substituted by two bases A that also results in amino acid alterations at Arg(162)Ser and Gly(236)Ser, respectively.

*Keywords:* *bla*TEM, cyanine, DNA-Microarray, Extended spectrum beta-lactamases (ESBLs), perfect match and mismatch, single nucleotide polymorphisms (SNPs)

1. Author for corresspondence: Tel: +84-24-3756 8286; Email: bui@ibt.ac.vn [↑](#footnote-ref-1)