

KHẢO SÁT PHƯƠNG PHÁP PCR-DGGE CHO PHÂN TÍCH ĐA DẠNG VI KHUẨN TRONG MẪU PHÂN CỦA TRẺ 6-24 THÁNG TUỔI

Nguyễn Thị Quý¹, Đào Trọng Khoa¹, Nguyễn Thị Thơm^{2,3}, Đỗ Thị Huyền^{1,2*}

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

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Bệnh viện 19-8, Bộ Công an

TÓM TẮT

Đa dạng vi khuẩn và mất cân bằng vi khuẩn trong phân của trẻ 6-24 tháng tuổi được cho là có liên quan đến nhiều bệnh như tiêu chảy, tỵ, dị ứng, chàm... Việc phân tích đa dạng cấu trúc vi khuẩn trong phân bằng phương pháp điện di trên gel gradient chất biến tính (DGGE) cho phép thực hiện trên một số lượng mẫu lớn, có khả năng so sánh cấu trúc vi sinh trong các mẫu và gợi ý được tình trạng mất cân bằng vi sinh cũng như xác định vi khuẩn gây bệnh có thể có. Để áp dụng được phương pháp DGGE trên đối tượng vi khuẩn trong mẫu phân trẻ khỏe mạnh và trẻ tiêu chảy kéo dài chưa rõ nguyên nhân, trong nghiên cứu này vùng V3, V6-V8 của gen 16S rDNA đã được khuếch đại bằng chương trình tough-up, tough-down và chương trình đặc hiệu từ hệ gen của 8 vi khuẩn đã biết, 5 đa hệ gen vi khuẩn của trẻ khỏe mạnh và 1 đa hệ gen của trẻ tiêu chảy kéo dài. Kết quả cho thấy, gel DGGE có nồng độ polyacrylamide 8% là thích hợp cho phân tách tốt, đa dạng vùng V3. Chương trình tough-up giúp khuếch đại được vùng V3 đa dạng hơn các chương trình PCR khác. Hàm lượng DNA gen V3 thích hợp nhất cho phân tích DGGE là 1 µg/giếng. Gel DGGE được nhuộm với SYBR-Gold cho độ nét và độ nhạy tốt, đảm bảo cho việc quét ảnh phân tích đánh giá đa dạng vi sinh vật trong các mẫu nghiên cứu.

Từ khóa: DGGE, chương trình PCR tough-up, đa dạng vi khuẩn trong phân, tiêu chảy kéo dài, vùng gen V3.

MỞ ĐẦU

Ở Việt Nam, tiêu chảy là một trong 10 bệnh phổ biến và đứng thứ 4 về tỷ lệ tử vong ở trẻ dưới 5 tuổi và tập trung chủ yếu ở trẻ 6-24 tháng tuổi. Tùy theo điều kiện y tế và dịch tễ, khoảng 3-20% trẻ tiêu chảy cấp diễn tiến thành tiêu chảy kéo dài. Mặc dù Bệnh viện Nhi trung ương đã áp dụng các phương pháp hiện đại như real-time PCR chẩn đoán 24 tác nhân gây tiêu chảy thông thường nhưng cũng có tới 47,39% trẻ không tìm được ra nguyên nhân (Vũ Thị Thu Hà *et al.*, 2016). Gần đây, bằng phương pháp giải trình tự thế hệ mới tìm hiểu đa hệ gen vi khuẩn trong phân của trẻ tiêu chảy ở một số nước, các nhà nghiên cứu nhận thấy sự thay đổi cấu trúc hệ vi sinh vật của trẻ (rối loạn hệ vi sinh) là nguyên nhân dẫn tới trẻ tiêu chảy kéo dài, khó hồi phục. Phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới là phương pháp đánh giá được toàn diện nhất sự mất cân bằng hệ vi sinh của trẻ nhưng phương pháp này chỉ đánh giá được trên từng cá thể, với chi phí tốn kém và mất nhiều thời gian, khó so sánh tình trạng mất cân bằng trên số lượng lớn trẻ trong cùng thời điểm. Mặc dù được xem là phương pháp có khả năng phân tích thấp hơn phương pháp giải trình tự nhưng các phương pháp dấu vân tay phân tử (molecular fingerprinting techniques) như điện di trên gel gradient biến tính (denaturing gradient gel electrophoresis - DGGE), đa hình độ dài đoạn giới hạn (restriction fragment length polymorphism - RFLP) hay đa hình cấu hình sợi đơn (single strand conformation polymorphism - SSCP) vẫn được sử dụng thường xuyên có giá trị để có thể so sánh sự biến động vi sinh trong hệ sinh thái liên quan đến các yếu tố tác động khác nhau (Westaway *et al.*, 2021). Phân tích DGGE vùng V3, V6-V8 (gọi tắt là vùng V68) của gen 16S rDNA thường được sử dụng trong đánh giá đa dạng vi khuẩn trong phân của trẻ để tìm ra sự mất cân bằng vi sinh trong bệnh như dị ứng (Štšepetova *et al.*, 2007, Bisgaard *et al.*, 2011) hay bệnh eczema (Forno *et al.*, 2008), tiêu chảy (Mai *et al.*, 2006).

Do phân có hệ vi sinh đa dạng nhất trong các hệ sinh thái, đặc biệt ở cơ thể người (Costea *et al.*, 2017) nên việc đánh giá đa dạng vi sinh, so sánh, xác định sự biến động vi sinh giữa nhóm chứng và nhóm bệnh bằng phương pháp DGGE cần được khảo sát. Các nghiên cứu trước đã chỉ ra nồng độ chất biến tính (gồm urea và formamide deionized, trong đó 100% chất biến tính gồm 7 M urea, 40% formamide deionized) thích hợp cho phân tách DGGE vùng gen V3 là 35-70% và vùng V68 là 40-60%. Một số tác giả đã cho rằng gel được nhuộm bằng bạc có độ nhạy tốt (Qiu *et al.*, 2012) nhưng một số tác giả lại cho rằng việc nhuộm gel DGGE bằng ethidium bromide và SYBR-Gold cho độ nhạy và độ nét tốt hơn (Huang, Fu, 2005). Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành

khảo sát một số yếu tố như nồng độ gel polyacrylamide, vùng gen V3, V68 của gen 16S rDNA, hàm lượng DNA và phương pháp thích hợp cho phân tích gen bằng DGGE để có thể đánh giá đa dạng vi khuẩn trong mẫu phân trẻ 6-24 tháng tuổi tốt nhất. Kết quả của công trình này sẽ định hướng phương pháp cho phân tích đa dạng vi khuẩn trong các mẫu phân của trẻ khỏe mạnh và trẻ tiêu chảy kéo dài, xem xét sự mất cân bằng vi khuẩn trong phân của trẻ tiêu chảy kéo dài.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

DNA hệ gen của 8 chủng vi khuẩn bao gồm *Escherichia coli* ATCC27117, *Bacillus cereus*, *B. subtilis* 168, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* Typhimurium (viết tắt là *S. Typhimurium*), *S. enterica* Enteritidis ATCC 13076 (viết tắt là *S. Enteritidis*), *Listeria fermentum*, *Enterococcus faecium* đã được tách chiết trong nghiên cứu trước (Nguyễn Hồng Dương *et al.*, 2023) được sử dụng làm khuôn khuếch đại gen 16S rDNA trước khi khuếch đại vùng gen V3, V68 trong thí nghiệm lựa chọn nồng độ gel polyacrylamide thích hợp cho phân tách DGGE hai vùng gen.

DNA đa hệ gen của vi khuẩn trong mẫu phân của trẻ khỏe mạnh H1 (bé gái 8 tháng tuổi), trẻ tiêu chảy kéo dài chưa rõ nguyên nhân B1 (bé gái 11 tháng tuổi bị tiêu chảy trên 14 ngày) được tách chiết từ nghiên cứu trước (Nguyễn *et al.*, 2023). Hai mẫu DNA đa hệ gen H1 và B1 được sử dụng để khảo sát phương pháp PCR khuếch đại vùng V3 cho việc đánh giá đa dạng và lựa chọn phương pháp nhuộm gel DGGE. DNA đa hệ gen vi khuẩn trong phân của 4 trẻ khỏe mạnh 6-24 tháng tuổi (ký hiệu H2-H5) dùng để khuếch đại vùng V3 cho thí nghiệm đánh giá hàm lượng gen V3 thích hợp cho phân tích DGGE. Việc thu mẫu phân cho nghiên cứu đã được Hội đồng Đạo đức của Bệnh viện Nhi trung ương chấp thuận cho phép theo Giấy chứng nhận số 1875/BVNTWW-HĐĐĐ ngày 10/7/2023.

Phương pháp PCR khuếch đại vùng gen V3, V68 và gen 16S rDNA từ hệ gen/đa hệ gen vi khuẩn

Gen 16S rDNA của vi khuẩn được khuếch đại bằng cặp mồi 27-F và 1527-R từ DNA hệ gen/đa hệ gen của vi khuẩn. Vùng gen V3, V68 được khuếch đại từ sản phẩm PCR gen 16S rDNA, sử dụng các trình tự mồi V3 (Ariefdjohan *et al.*, 2010, Fei *et al.*, 2016) V68 (Mai *et al.*, 2006) được liệt kê trong Bảng 1 trong đó trình tự clamp là 5' CGC CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG 3'. PCR được tiến hành trong tổng thể tích 25 µl gồm 2,5 µl đệm PCR 10x, 2,0 µl dNTP (2 mM), 1,0 µl mỗi mồi loại (10 µM), 5,0 µl DNA khuôn (2 ng/µl), 0,25 µl DreamTaq DNA polymerase (5 U/µl, Fermentas). Chương trình PCR sử dụng cho khảo sát khuếch đại đa dạng vùng gen V3, V68 gồm ba chương trình. Chương trình đặc hiệu (ký hiệu là N) có nhiệt độ bắt cặp mồi với sợi khuôn là 55°C, chương trình tough-up (ký hiệu là U) có nhiệt độ gắn mồi tăng dần trong mỗi 5 chu kỳ từ 50°C, 52°C, 55°C và cuối cùng là 20 chu kỳ có nhiệt độ gắn mồi ở 58°C. Chương trình tough-down tương tự như chương trình tough-up nhưng nhiệt độ bắt cặp mồi với sợi khuôn giảm dần từ 58°C xuống 52°C, cuối cùng là 20 chu kỳ với nhiệt độ mồi bắt cặp sợi khuôn là 50°C. Tổng số chu kỳ trong các chương trình PCR là 35 chu kỳ (Nguyễn Hồng Dương *et al.*, 2023). Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8% (Sambrook *et al.*, 2001). Hàm lượng DNA và chất lượng DNA được đo bằng máy Nanodrop 2000 (Implen).

Bảng 1. Danh sách mồi dùng để khuếch đại gen 16S rDNA, các vùng gen V3, V6-V8

Gen	Kích thước	Tên mồi	Trình tự mồi
Gen 16S rDNA	1500 bp	27-F	5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCAG-3'
		1527-R	5'-AGA AAG GAG GTG ATC CAGCC-3'
Vùng gen V3	180 bp	BA338F-GC	5'-GC-clamp GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3'
		UN518R	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'
Vùng gen V6-V8	433 bp	U968F-GC	5'-GC-clamp GAA CGC GAA GAA CCT TAC-3'
		L1401R	5'-GCG TGT GTA CAA GAC CC-3'

Phân tích vùng gen V3, V68 bằng DGGE

Vùng gen V3, V68 sau khi khuếch đại được phân tích bằng điện di DGGE như được mô tả bởi Hovda và đồng tác giả (Hovda *et al.*, 2007) trên hệ thống máy VS20-DGGETC system (Clever Scientific Ltd, England). Trong đó vùng V3 được phân tích trên gel có nồng độ chất biến tính từ 35% đến 70%, vùng V68 được phân tích trên gel có nồng độ chất biến tính từ 40 đến 60%. Nồng độ polyacrylamide trên bản gel được khảo sát ở hai nồng độ là 6% và 8%. Điện di được tiến hành trong đệm TAE 1x (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) ở 60°C, 20V trong 10 phút sau đó tăng lên 70V trong 18 giờ. Sau khi điện di, gel được xử lý nhuộm với ba phương pháp là ethidium bromide (0,5 mg/l) hoặc SYBR-Gold (S11494, Thermo Scientific, USA) pha loãng 10000 lần trong đệm TAE 1x,

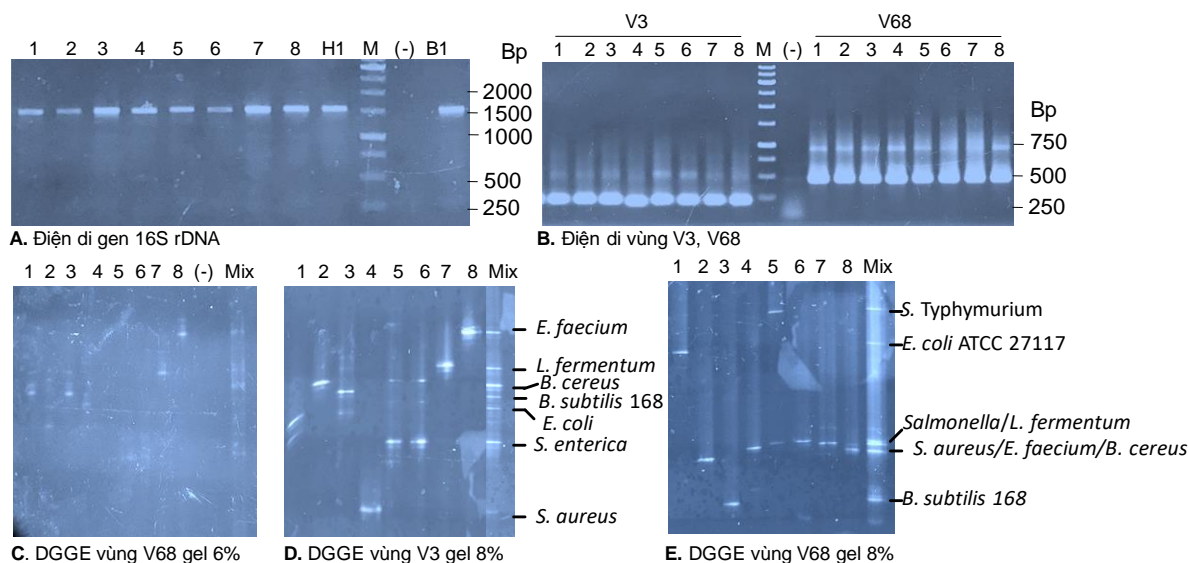
pH 7,6 và nhuộm bạc theo phương pháp số 2 của Qiu và đồng tác giả năm 2012 (Qiu *et al.*, 2012).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát nồng độ gel polyacrylamide cho phân tích vùng V3, V68

Để đảm bảo độ ổn định cho việc khuếch đại vùng V3, V68 của 8 chủng vi khuẩn khảo sát, và của đa hệ gen vi khuẩn trong mẫu H1, B1, gen 16S rDNA và đa hệ gen 16S rDNA của các vi khuẩn đã được khuếch đại bằng PCR sử dụng mỗi và chương trình PCR đặc hiệu từ hệ gen của các chủng khảo sát và đa hệ gen của mẫu H1, B1. Kết quả (Hình 1) cho thấy gen 16S rDNA có cùng kích thước khoảng 1,5 kb đã được khuếch đại thành công từ 8 chủng vi khuẩn và hai DNA đa hệ gen B1, H1. Gen được khuếch đại đặc hiệu, không có băng phụ (Hình 1A) trong đó mẫu đối chứng âm không có băng nào được khuếch đại. Sử dụng sản phẩm PCR gen 16S rDNA này làm khuôn, các vùng V3, V68 của vi khuẩn cũng đã được khuếch đại thành công với hàm lượng DNA thu được lớn (khoảng 100 ng/μl). Vùng gen V3 được khuếch đại có kích thước thấp hơn DNA chuẩn 250 bp, tương ứng với kích thước mong đợi là 180 bp. Vùng V68 được khuếch đại có kích thước thấp hơn băng DNA chuẩn 500 bp, tương ứng với kích thước mong đợi là 433 bp (Hình 1B).

Các vùng gen V3, V68 đã được phân tích trên gel DGGE với nồng độ polyacrylamide 6%, tuy nhiên, chỉ có vùng V68 xuất hiện các băng DNA nhưng rất mờ, không rõ ràng (Hình 1C) còn vùng V3 hoàn toàn không nhìn thấy băng điện di (kết quả không được trình bày). Khi tăng nồng độ gel polyacrylamide lên 8%, các băng DNA vùng V3, V68 của các vi khuẩn đã thể hiện rõ ở tất cả các mẫu (Hình 1D, E). Vùng V3 có khả năng phân tách khá tốt, đặc biệt ở khả năng phân biệt các vi khuẩn trong cùng chi. Vùng V3 của các vi khuẩn ở các chi khác nhau dừng ở các vị trí cách nhau khá xa trên gel điện di và quan sát rõ hơn ở đường chạy Mix (Hình 1D). Trình tự có quãng đường di chuyển dài hơn thể hiện trình tự giàu GC hơn so với các trình tự khác do các trình tự này có nhiệt độ nóng chảy cao hơn nên dừng ở vùng gel có nồng độ chất biến tính cao hơn. Theo đó, vùng V3 của *E. faecium* di chuyển quãng đường ngắn nhất, tiếp đó là vùng V3 của *L. fermentum*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* và cuối cùng là *S. aureus*. Đáng chú ý, vùng V3 của *B. cereus*, *B. subtilis* có trình tự gần giống nhau nên nằm gần nhau. Vùng V3 của *S. Typhimurium* và *S. Enteritidis* cùng ở vị trí như nhau trên điện di đồ vì vùng V3 của hai vi khuẩn này tương đồng nhau về trình tự vì cùng trong một loài *S. enterica* (Hình 1D). Điều đó cho thấy, phân tích vùng V3 trên DGGE của các chủng vi khuẩn này có khả năng đánh giá độ đa dạng và quan hệ di truyền của các vi khuẩn.



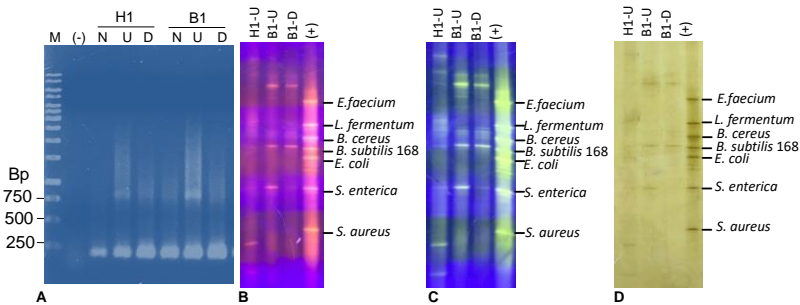
Hình 1. Lựa chọn nồng độ gel polyacrylamide cho phân tách vùng V3, V68

A: Điện di đồ phân tích gen/đa hệ gen 16S rDNA khuếch đại từ DNA hệ gen của 8 chủng vi khuẩn và đa hệ gen vi khuẩn trong mẫu phân của trẻ khỏe mạnh và trẻ tiêu chảy kéo dài. B: Điện di đồ phân tích vùng gen V3, V68 được khuếch đại từ khuôn là sản phẩm PCR gen 16S rDNA; C: Điện di đồ DGGE trên gel polyacrylamide 6% phân tách vùng V68; D, E: Điện di đồ DGGE trên gel polyacrylamide 8% phân tách vùng V3, V68 tương ứng. (-) Đối chứng âm không chứa DNA khuôn; M: DNA chuẩn 1 kb (Fermentas); 1-8: Sản phẩm PCR có nguồn gốc tương ứng từ *E. coli* ATCC 27117, *B. cereus*, *B. subtilis* 168, *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* ATCC 13076, *L. fermentum*, *E. faecium*. H1, B1: Tương ứng với DNA đa hệ gen từ mẫu phân của trẻ khỏe mạnh; trẻ tiêu chảy kéo dài; Mix: Hỗn hợp vùng V3 của 8 chủng chỉ thị từ 1 đến 8.

Ngược lại, mặc dù vùng V3 được phân tách tốt trên gel DGGE ở nồng độ gel polyacrylamide 8% nhưng vùng V68 của 8 chủng vi khuẩn không được phân tách tốt và không đặc trưng cho chi, loài. Điển hình, vùng V68 của *S. Typhimurium* nằm ở vị trí cao nhất trên gel sau đó đến vùng V68 của *E. coli* ATCC27117 và cuối cùng là *B. subtilis* 168. Tuy nhiên, vùng V68 của các vi khuẩn *Salmonella*, *L. fermentum* lại nằm cùng trên một vùng, và rất gần, khó phân biệt với vùng V68 của *S. aureus*, *E. faecium*, *B. cereus*. Vì vậy, việc sử dụng vùng gen V68 cho đánh giá đa dạng vi khuẩn và phân biệt vi khuẩn trong các mẫu môi trường, đặc biệt là trong phần nơi có cộng đồng vi khuẩn rất phức tạp là rất khó khăn. Vùng gen V68 cũng đã được khảo sát phân tách ở gradient nồng độ chất biến tính 30-75% nhưng sự phân tách vùng V68 của các chủng cũng không được cải thiện. Do vậy, vùng V3 sẽ được sử dụng để khảo sát phương pháp nhuộm gel DGGE và hàm lượng DNA đưa lên gel. Hỗn hợp V3 của 8 chủng được trộn với hàm lượng tương đương để làm đối chứng dương trong các thí nghiệm tiếp theo.

Khảo sát phương pháp nhuộm gel DGGE

Trong các nghiên cứu trước, chương trình tough-up đã được chứng minh có khả năng khuếch đại đa gen 16S rDNA từ đa hệ gen vi khuẩn trong mẫu phân đa dạng hơn chương trình tough-down và chương trình đặc hiệu. Chương trình tough-down cũng cho độ đa dạng của gen 16S rDNA tốt hơn chương trình đặc hiệu (Nguyễn Hồng Dương *et al.*, 2023). Trong nghiên cứu này, đa gen 16S rDNA của vi khuẩn từ mẫu phân của trẻ khỏe mạnh và trẻ tiêu chảy kéo dài được khuếch đại bằng chương trình tough-up. Đa gen 16S rDNA này được dùng làm khuôn cho khuếch đại vùng V3 bằng ba chương trình tough-up, tough-down và chương trình đặc hiệu. Kết quả (Hình 2A) cho thấy vùng gen V3 đã được khuếch đại ở cả ba chương trình nhưng vùng gen V3 có kích thước đa dạng hơn, hàm lượng cao hơn ở mẫu PCR sử dụng chương trình tough-up. Trên bản điện di, vùng gen V3 khuếch đại bằng chương trình tough-up có thêm các băng phụ đậm hơn, nét hơn so với sản phẩm khuếch đại bằng chương trình đặc hiệu (chỉ có một băng đặc hiệu duy nhất, với lượng thấp hơn khi điện di với cùng thể tích mẫu). Kết quả này cũng tương đồng với các nghiên cứu trước, trong đó ở các chu kỳ đầu của chương trình PCR, nhiệt độ gắn mỗi thấp đã giúp khuếch đại được các trình tự có số bản copy thấp có trong mẫu và số lượng mỗi bám được vào sợi khuôn tăng, giúp khuếch đại DNA với hàm lượng lớn (Pechgit *et al.*, 2011). Kết quả thử nghiệm nhuộm gel DGGE bằng các phương pháp khác nhau cho thấy, trong ba gel được nhuộm bằng SYBR-Gold, ethidium bromide và nhuộm bạc thì bản gel được nhuộm bằng bạc cho độ phát hiện băng kém nhất, các băng không rõ ràng, không nét và đây cũng là phương pháp nhuộm phức tạp nhất (Hình 2D). Phương pháp nhuộm SYBR-Gold và nhuộm ethidium là phương pháp nhuộm đơn giản nhưng cho độ nét của băng tốt hơn, phổ băng phát hiện cũng nhiều hơn (Hình 2B, C). Trong đó, phương pháp nhuộm bằng SYBR-gold cho băng rõ nét nhất, đa dạng nhất. Tương đồng với kết quả này, nghiên cứu trước đây so sánh việc sử dụng phương pháp nhuộm gel bằng SYBR-Gold và ethidium cũng cho thấy SYBR-Gold có độ nhạy tốt hơn (Huang, Fu, 2005, Tuma *et al.*, 1999). Phương pháp nhuộm gel bằng ethidium bromide rẻ nhưng độc. Vì vậy, phương pháp nhuộm gel bằng SYBR-Gold được lựa chọn cho các thí nghiệm sau.



Hình 2. Điện di đồ phân tích sản phẩm khuếch đại vùng gen V3 từ mẫu phân trẻ khỏe mạnh và trẻ tiêu chảy kéo dài (A) và DGGE phân tích vùng gen được nhuộm bằng ethidium bromide (B), SYBR-Gold (C) và bạc (D)

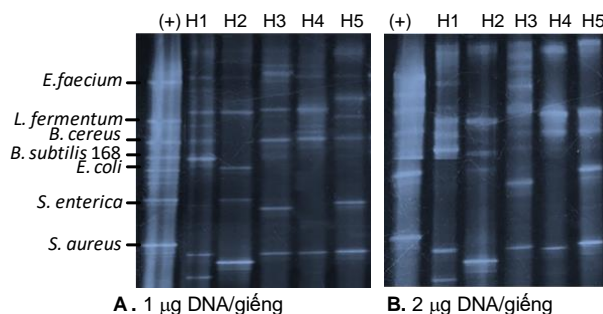
M: DNA chuẩn 1 kb (*Fermentas*); (-) Đối chứng âm không chứa DNA khuôn; H1: DNA khuôn có nguồn gốc từ trẻ khỏe mạnh; B1: DNA có nguồn gốc từ mẫu phân của trẻ tiêu chảy; N, U, D: Tương ứng là DNA được khuếch đại bằng chương trình đặc hiệu, tough-up và tough-down; (+): Đối chứng dương.

Kết quả phân tích DGGE cũng cho thấy, ở mẫu phân trẻ tiêu chảy kéo dài, vùng V3 được khuếch đại bằng chương trình tough-up cho độ đa dạng băng cao hơn so với chương trình tough-down. Điều đó chứng tỏ để phân tích đa dạng vi khuẩn trong một mẫu, việc sử dụng chương trình tough-up sẽ cho kết quả tốt hơn là hai chương trình còn lại. So sánh giữa mẫu chứng và mẫu bệnh, trẻ bị tiêu chảy có xu hướng giảm mức độ đa dạng vi khuẩn. Kết quả trên Hình 2 cũng chỉ ra rằng mẫu từ trẻ khỏe mạnh có số băng nhiều hơn mẫu bệnh nên mẫu khỏe mạnh có xu hướng có hệ vi sinh vật đa dạng hơn.

Khảo sát hàm lượng DNA vùng V3 thích hợp cho phân tích DGGE

Trong các mẫu phân, vi sinh vật trong mẫu rất đa dạng. Vì vậy, việc lựa chọn hàm lượng DNA thích hợp cho phân tích DGGE là cần thiết. Trong các thí nghiệm trên, hàm lượng V3 được phân tích trên mỗi giếng là 1 µg.

Trong thí nghiệm này, để đánh giá chính xác hơn hàm lượng DNA thích hợp cho phân tích DGGE, vùng V3 gen 16S rDNA của đa hệ gen vi khuẩn từ 5 trẻ khỏe mạnh H1-H5 đã được khuếch đại và phân tích DGGE. Kết quả (Hình 3) cho thấy vùng V3 của đa gen vi khuẩn đã được phân tách khá tốt trên gel DGGE, các băng DNA đều thể hiện rõ nét trong cả 5 mẫu. Mặc dù là mẫu khỏe mạnh nhưng đa dạng vùng V3 ở các mẫu khác nhau là khác nhau về cả số lượng băng và vị trí của các băng DNA trên điện di đồ (Hình 3A). Điều này chứng tỏ vi khuẩn ở các mẫu chứng cũng rất đa dạng. Dựa trên phổ băng DNA có thể thấy đa dạng vi khuẩn trong mẫu H1 khác hẳn với 4 mẫu còn lại. Mẫu H3, H4 có sự tương đồng nhau về phổ băng hơn cả. Như vậy, rất có thể đa dạng vi khuẩn mẫu H3, H4 giống nhau hơn so với mẫu H1. Nhìn trên hai bản điện di thì có thể thấy hàm lượng DNA thích hợp đưa lên giếng DGGE là 1 µg vì ở hàm lượng này các băng thể hiện rõ nét, không bị nhòe phủ sang các băng bên cạnh tạo thuận lợi cho việc quét băng đánh giá đa dạng trong các mẫu. Khi tăng lên hàm lượng 2 µg/giếng điện di, các băng có sự giao thoa, nhòe với các băng lân cận làm cho độ nét của băng kém hơn. Theo tìm hiểu của tác giả, không có tài liệu khoa học nghiên cứu khảo sát hàm lượng DNA thích hợp cho phân tích DGGE nhưng trong một diễn đàn, các nhà nghiên cứu đã thảo luận, chia sẻ có thể sử dụng hàm lượng DNA vùng V3 từ 250 ng-750 ng/giếng điện di là đủ. Tuy nhiên, để nghiên cứu được đa dạng vi sinh trong mẫu sinh thái, việc tăng hàm lượng DNA cho phân tích là cần thiết. Vì vậy, để phân tích đa dạng vi khuẩn dựa trên vùng V3, lượng DNA thích hợp để đưa lên giếng cho phân tích là 1 µg/giếng.



Hình 3. Điện di đồ DGGE phân tích vùng gen V3 của vi khuẩn trong mẫu phân từ 5 trẻ khỏe mạnh với hàm lượng DNA khác nhau 1 µg/giếng (A) và 2 µg/giếng (B)

(+): Đối chứng dương; H1-H5: DNA có nguồn gốc từ mẫu phân của trẻ khỏe mạnh H1-H5.

KẾT LUẬN

Vùng V3 gen 16S rDNA của vi khuẩn trong mẫu phân trẻ khỏe mạnh và trẻ tiêu chảy kéo dài đã được phân tích thành công bằng phương pháp PCR-DGGE trên gel polyacrylamide 8%, nồng độ chất biến tính 35-70% với hàm lượng DNA được đưa vào phân tích trên mỗi giếng điện di là 1 µg. Phổ băng DNA của V3 trên điện di đồ ở các mẫu khác nhau là khác nhau thể hiện sự đa dạng của vi sinh vật có trong mẫu.

Lời cảm ơn: Công trình được hỗ trợ kinh phí từ đề tài nghiên cứu mã số DTĐLCN.63/22 (Bộ Khoa học và Công nghệ) và trang thiết bị của Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ariefdjohan MW, Savaiano DA, Nakatsu CH (2010). Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens. *Nutr J*, 9: 23.
- Bisgaard H, Li N, Bonnelykke K, Chawes BLK, Skov T, Paludan-Müller G, Stokholm J, Smith B, Krogfelt KA (2011). Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J Allergy Clin Immunol*, 128: 646-652.e5.
- Costea PI, Zeller G, Sunagawa S, Pelletier E, Alberti A, Levenez F, Tramontano M, Driessen M, Hercog R, Jung FE, Kultima JR, Hayward MR, Coelho LP, Allen-Vercoe E, Bertrand L, Blaut M, Brown JRM, Carton T, Cools-Portier S, Daigneault M, Derrien M, Druésne A, de Vos W, Finlay BB, Flint HJ, Guarner F, Hattori M, Heilig H, Luna RA, van Hylckama Vlieg J, Junick J, Klymiuk I, Langella P, Le Chatelier E, Mai V, Manichanh C, Martin JC, Mery C, Morita H, O'Toole PW, Orvain C, Patil KR, Penders J, Persson S, Pons N, Popova M, Salonen A, Saulnier D, Scott KP, Singh B, Slezak K, Veiga P, Versalovic J, Zhao L, Zoetendal EG, Ehrlich SD, Dore J, Bork P (2017). Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. *Nat Biotechnol*. 35 (11):1069-1076.
- Fei P, Li L, Cai X, Zhang X, Bai HJ, Jiang YJ, Feng Z, Guo L (2016). Differences in the biodiversity of the fecal microbiota of infants with Rotaviral diarrhea and healthy infants. *Jundishapur J Microbiol*, 9: e32356.
- Forno E, Onderdonk AB, McCracken J, Litonjua AA, Laskey D, Delaney ML, Dubois AM, Gold DR, Ryan LM, Weiss ST, Celedon JC, (2008). Diversity of the gut microbiota and eczema in early life. *Clin Mol Allergy*. 6: 11.
- Hovda MB, Sivertsvik M, Tore Lunestad B, Lorentzen G, Rosnes JT (2007) Characterisation of the dominant bacterial population in modified atmosphere packaged farmed halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) based on 16S rDNA-DGGE. *Food*

Microbiol, 24: 362-371.

Huang Q, Fu WL (2005) Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis. *Clin Chem Lab Med*, 43: 841–842.

Mai V, Braden CR, Heckendorf J, Pironis B, Hirshon JM (2006). Monitoring of stool microbiota in subjects with diarrhea indicates distortions in composition. *J Clin Microbiol* 44: 4550-4552.

Nguyễn Hồng Dương, Nguyễn Thị Quý, Ngọc Thu Thảo, Nghiêm Đỗ Như Thảo, Phùng Thị Bích Thủy, Đỗ Thị Huyền (2023). Nghiên cứu phương pháp PCR-RFLP gen 16S rRNA để đánh giá đa dạng vi khuẩn trong phân trẻ tiêu chảy không rõ nguyên nhân. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 526: 182-189.

Nguyen TQ, Phung TBT, Ngoc TT, Do TH (2023). A comparison of five methods for effective extraction of bacterial metagenomic DNA from stools of children suffer from diarrhea with unknown cause. *Biol Forum - Int J*, 15: 1-9.

Qiu S, Chen J, Lin S, Lin X (2012). A comparison of silver staining protocols for detecting DNA in polyester-backed polyacrylamide gel. *Braz J Microbiol*, 43: 649–652.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 11. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Štšepetova J, Sepp E, Julge K, Vaughan E, Mikelsaar M, de Vos WM (2007). Molecularly assessed shifts of *Bifidobacterium* ssp. and less diverse microbial communities are characteristic of 5-year-old allergic children. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 51: 260-269.

Tuma RS, Beaudet MP, Jin X, Jones LJ, Cheung CY, Yue S, Singer VL (1999). Characterization of SYBR Gold nucleic acid gel stain: a dye optimized for use with 300-nm ultraviolet transilluminators. *Anal Biochem*, 268: 278-288.

Vũ Thị Thu Hà, Nguyễn Tuấn Khiêm, Tăng Chí Thượng, Trần Thị Mộng Hiệp (2016). Khảo sát đặc điểm bệnh tiêu chảy kéo dài ở trẻ em tại bệnh viện Nhi đồng 2. *Nghiên Cứu Y Học - Y Học TP Hồ Chí Minh*, 20: 96-102.

Westaway JAF, Huerlimann R, Miller CM, Kandasamy Y, Norton R, Rudd D (2021). Methods for exploring the faecal microbiome of premature infants: a review. *Matern Health Neonatol Perinatol*, 7: 11.

INVESTIGATION OF PCR-DGGE METHOD FOR ANALYZING BACTERIAL DIVERSITY IN FECAL SAMPLES FROM CHILDREN OF 6-24 MONTHS OLD

Nguyen Thi Quy¹, Dao Trong Khoa¹, Nguyen Thi Thom^{2,3}, Do Thi Huyen^{1,2*}

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

³*19-8 Hospital, Ministry of public security*

SUMMARY

Bacterial diversity and bacterial dysbiosis in stools of children at 6-24 months old are related to many diseases such as diarrhea, autism, obesity, allergies, eczema, etc. Analysis of bacterial diversity by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) method allows spontaneously performing on a large number of samples, capable of comparing the structure of microbial diversity in the samples and suggesting the status of bacterial imbalance or possible pathogens presence in the feces. To successfully apply the DGGE method for analysis of the bacterial structure and diversity in the feces of healthy children and persistent diarrheal children with undetected-pathogens, in this study V3, V6-V8 regions of the 16S rDNA gene were amplified from the genomic DNA of 8 bacteria, 5 bacterial metagenomic DNA extracted from the feces of healthy children and a metagenomic DNA from feces of a child with persistent diarrhea, using tough-up, tough-down and specific PCR programs. The results showed that DGGE gel contained 8% polyacrylamide concentration was suitable for separating diverse V3 regions of bacteria. The V3 region that was amplified by tough-up program exhibited more diverse than one amplified by other PCR programs. The V3 DNA content of 1 µg per well was enough for analyzing this region by DGGE. DGGE gel stained with SYBR-Gold presented good sharpness and sensitivity for analysis of bacterial diversity in research samples.

Keywords: DGGE, PCR tough-up program, bacterial diversity, persistent diarrhea, V3 gene region.

* Author for correspondence: Tel: +84-4-7917021; Email: dohuyen@ibt.ac.vn