

Xây dựng qui trình khuếch đại axit nucleic đẳng nhiệt Recombinase Polymerase Amplification (RPA) phát hiện nhanh gen *hly* của vi khuẩn *Listeria monocytogenes*

Trần Thị Hậu*, Trần Hồng Diễm, Phùng Thị Thu Hường

Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT, Đại học Nguyễn Tất Thành

*tthau@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Listeria monocytogenes là một trong những vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm phổ biến, có khả năng dẫn đến tử vong cho người nhiễm khuẩn. *L. monocytogenes* thường được phát hiện bằng kỹ thuật vi sinh truyền thống hoặc phương pháp sinh học phân tử phổ biến như Polymerase Chain Reaction (PCR). Tuy nhiên, khả năng ứng dụng phát hiện *L. monocytogenes* của các kỹ thuật này bị hạn chế do sự tốn kém về thời gian thực hiện và các yêu cầu nghiêm ngặt về thiết bị cũng như kỹ thuật viên có kinh nghiệm. Nghiên cứu này đã xây dựng phương pháp khuếch đại axit nucleic đẳng nhiệt Recombinase Polymerase Amplification (RPA) để phát hiện nhanh và chính xác gen *hly* của vi khuẩn *L. monocytogenes*. Kết quả nghiên cứu cho thấy, trình tự mỗi thiết kế cho phản ứng RPA đã nhân bản thành công gen *hly* của vi khuẩn *L. monocytogenes*. Phản ứng RPA được thiết lập ở điều kiện nhiệt độ và thời gian tối ưu là 39 °C trong 25 phút. Giới hạn phát hiện tối thiểu của phản ứng RPA là 310 fg đối với DNA tách chiết, nhạy gấp 1000 lần so với phản ứng PCR truyền thống. Phương pháp RPA với ưu điểm nhanh, nhạy, có tiềm năng thay thế các phương pháp phát hiện truyền thống và phát triển thành bộ kit ứng dụng để phát hiện nhanh vi khuẩn *L. monocytogenes*.

Nhận 03.12.2020

Được duyệt 16.12.2020

Công bố 30.12.2020

Từ khóa

gen *hly*,
khuếch đại đẳng nhiệt,
Listeria monocytogenes,
Polymerase Chain
Reaction, Recombinase
Polymerase
Amplification.

© 2020 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Listeria monocytogenes thuộc nhóm các loại vi khuẩn đường ruột phổ biến, là tác nhân gây ngộ độc thực phẩm nguy hiểm và gây bệnh nhiễm khuẩn *Listeria* ở người. Bệnh nhiễm khuẩn *Listeria* là một căn bệnh truyền nhiễm, bệnh lan truyền chủ yếu qua con đường tiêu thụ thực phẩm bị nhiễm khuẩn *L. monocytogenes*, bệnh hiếm khi xảy ra nhưng tỉ lệ nhập viện và tử vong cao (20% – 30%) [1]. *L. monocytogenes* thường được tìm thấy trong sữa tươi chưa tiệt trùng hoặc phô mai mềm. Khác với nhiều loại vi khuẩn gây bệnh truyền qua thực phẩm khác, *L. monocytogenes* có thể tồn tại và phát triển ở nhiệt độ thấp, tăng trưởng chậm trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4 °C [2]. Do đó, việc tiêu thụ các loại thực phẩm từ thịt chế biến sẵn, được bảo quản bằng cách trữ mát hoặc trữ đông cũng là một yếu tố nguy cơ gây ra sự nhiễm khuẩn. Theo báo cáo của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), một đợt bùng phát bệnh nhiễm khuẩn *Listeria* đã xảy ra tại Nam Phi năm 2018 với 978 trường hợp được xác nhận nhiễm và 180 ca tử vong

do nhiễm *L. Monocytogenes* [3]. Hầu hết các trường hợp nhiễm khuẩn là trẻ sơ sinh, phụ nữ có thai, người già và người suy giảm hệ miễn dịch. Ngộ độc thực phẩm do *L. monocytogenes* có thể gây hậu quả nghiêm trọng như gây trụy thai hoặc thai chết lưu và khi xâm nhập vào máu gây nhiễm trùng máu hoặc lây lan sang hệ thần kinh gây viêm màng não, có thể dẫn đến tử vong [4]. Tại Việt Nam, một phân tích đã ghi nhận về 3 trường hợp người trưởng thành bị viêm màng não do *L. Monocytogenes* [5].

L. monocytogenes có thể được phát hiện bằng phương pháp vi sinh truyền thống hoặc kỹ thuật nhân bản axit nucleic đặc trưng của vi khuẩn, phổ biến như PCR. Phương pháp nuôi cấy vi sinh truyền thống để phát hiện *L. monocytogenes* thường tốn thời gian và phức tạp vì đòi hỏi một môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự sinh trưởng của *L. Monocytogenes* [6]. Hơn nữa, một số các xét nghiệm sinh hóa được yêu cầu thực hiện để xác định chính xác sự hiện diện của *L. monocytogenes* trước khi phân lập thuần chủng [7]. Vài thập kỉ gần đây, kỹ thuật PCR nhân bản axit



nucleic cũng được sử dụng rộng rãi trong phát hiện nhiều tác nhân virus, vi khuẩn gây bệnh khác nhau, nhờ vào những ưu điểm nổi bật về độ nhạy và độ tin cậy của xét nghiệm mang lại [8]. Tuy nhiên, qui trình thực hiện PCR yêu cầu một chu trình nhiệt phức tạp với máy PCR chuyên biệt, đắt tiền cũng như kỹ thuật viên có kinh nghiệm trong thao tác thí nghiệm. Do đó, khả năng ứng dụng xét nghiệm lâm sàng của các phương pháp phát hiện truyền thống để phát hiện *L. monocytogenes* trong điều kiện thiếu thốn trang thiết bị bị hạn chế.

Gần đây, các phương pháp khuếch đại axit nucleic đẳng nhiệt cũng được nghiên cứu ứng dụng rộng rãi trong phân tích các mầm bệnh vi sinh vật nhằm loại bỏ các bước vòng luân nhiệt trong quá trình khuếch đại của phương pháp PCR [9-11]. Trong đó, RPA được đánh giá là một phương pháp có nhiều ưu điểm nổi trội như độ đặc hiệu và độ nhạy cao trong phát hiện gen mục tiêu với giới hạn phát hiện lí tưởng. Qui trình thực hiện RPA nhanh chóng, đơn giản, phản ứng hoạt động ở một nhiệt độ thấp (trong khoảng 37 °C – 42 °C), thời gian phản ứng cho kết quả trong vòng 15 – 30 phút, chỉ sử dụng hai môi được thiết kế bắt cặp đặc hiệu với trình tự mục tiêu [12]. Trong khi phương pháp nhân gen đẳng nhiệt đã được ứng dụng phổ biến như khuếch đại trung gian vòng lặp Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) yêu cầu từ 4 đến 6 môi để phản ứng hoạt động. RPA nhân bản các đoạn DNA mục tiêu bằng cách gắn kết mỗi với trình tự DNA mục tiêu nhờ enzyme recombinase RecA. Recombinase là một enzyme xúc tác quá trình lai của các đoạn mỗi với trình tự đích tương đồng. Các cấu trúc tạo ra được ổn định bằng các protein liên kết sợi đơn single-strain binding (SSB), chúng tương tác với sợi DNA khuôn mẫu đang tách ra và ngăn ngừa sự tách ra của mỗi khỏi mạch khuôn. Mỗi được kéo dài để hình thành mạch mới nhờ enzyme DNA polymerase [12]. Tất cả các enzyme quan trọng cho phản ứng được tổng hợp thành dạng thuốc thử đông khô trong bộ kit RPA điển hình, tiện lợi cho việc sử dụng cũng như vận chuyển và bảo quản kit.

Thực tế, trên thế giới đã có nhiều công bố về ứng dụng của phương pháp RPA trong phát hiện hiệu quả các tác nhân vi khuẩn, virus gây bệnh như *Salmonella enterica*, *Vibrio parahaemolyticus* gây ngộ độc thực phẩm, *Mycobacterium ulcerans* gây nhiễm trùng da và viêm dưới da, vi rút gây dịch tả lợn châu Phi, Adenovirus gây bệnh ở người [13–17]. Ở Việt Nam, kỹ thuật RPA chưa phổ biến, nhưng gần đây RPA đã bắt đầu được nghiên cứu ứng dụng và mang lại thành công trong việc xác định một số tác nhân gây bệnh như *Plasmodium falciparum* và *Plasmodium vivax* gây bệnh sốt rét [18]. Ngoài ra, RPA còn được đánh giá là một phương pháp tiềm năng trong chẩn đoán virus gây bệnh ở cây trồng [19]. Kỹ thuật RPA với thao tác đơn giản, nhanh và chính xác hoàn toàn có

thể trở thành một trong những phương pháp chẩn đoán các tác nhân gây bệnh một cách hiệu quả trong thời gian tới. Nghiên cứu này xây dựng qui trình RPA nhằm phát hiện nhanh vật liệu di truyền của vi khuẩn *L. monocytogenes* với mong muốn góp phần vào xây dựng công cụ kiểm soát và ngăn chặn nguy cơ bùng phát ngộ độc thực phẩm trên diện rộng ở Việt Nam.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Nuôi cấy và tách chiết DNA vi khuẩn

L. monocytogenes và các chủng vi khuẩn đường ruột phổ biến bao gồm *Salmonella enterica* (ATCC14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), *Clostridium perfringens* (ATCC10543), *Bacillus cereus* (ATCC14579) là các chủng thương mại và *Vibrio parahaemolyticus* do Viện Kỹ thuật Công nghệ cao Đại học Nguyễn Tất Thành tự phân lập, định danh được lưu trữ ở Phòng thí nghiệm vi sinh thuộc Viện. 0,1 mL dịch khuẩn *L. monocytogenes* huyền phù ban đầu được cấy chuyển vào 10 mL môi trường lỏng Brain Heart Infusion (BHI) (HiMedia, Ấn Độ) vô trùng, nuôi lắc 180 vòng/phút qua đêm ở 37 °C. Các chủng vi khuẩn khác sử dụng trong nghiên cứu cũng được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường lỏng Luria Bertani (LB) (HiMedia, Ấn Độ) ở điều kiện tương tự. Thao tác nuôi cấy tất cả các chủng vi khuẩn được thực hiện trong tủ cấy an toàn sinh học cấp II ESCO AC42 (Singapore).

1 mL dung dịch tăng sinh *L. monocytogenes* được li tâm thu tế bào, sau đó bổ sung 800 µl đệm li giải tế bào có chứa 2 % Cetrimonium bromide (CTAB), 100mM Tris-HCL (pH = 8), 20mM EDTA (pH = 8), 1,4M NaCl (Bio Basic, Canada), ủ 65 °C trong 1 giờ. Li tâm 14.000 vòng/phút ở 4 °C trong 15 phút để thu hỗn hợp tách chiết có chứa DNA vi khuẩn. Các thành phần không mong muốn trong hỗn hợp như polysaccharide, protein được loại bỏ bằng bước rửa Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (PCI) (25: 24: 1), li tâm lạnh và thu lớp dịch trên cùng. DNA được rửa bằng Etanol 99 % theo tỉ lệ thể tích gấp 2,5 lần thể tích dịch chứa DNA tách chiết. Tủa DNA được hòa tan trong 50 µl nước sinh học phân tử và bảo quản ở -20 °C cho tới khi sử dụng. Độ tinh sạch và nồng độ DNA được xác định thông qua phương pháp đo quang sử dụng máy Jenway Genova Plus và Cuvet Traycell hellma Analytics 10X (Jenway, Anh).

2.2 Thiết kế mỗi

Mỗi RPA được thiết kế đặc hiệu theo hướng dẫn của TwistDx (Cambridge, Mỹ) để nhận diện vùng gen *hly* của vi khuẩn *L. Monocytogenes* [20]. Trình tự mục tiêu (CP023861.1) được tải về từ Genbank. Trình tự mỗi sau khi thiết kế được gửi tổng hợp tại Integrated DNA Technologies IDT (Singapore).

2.3 Thiết lập phản ứng PCR

Phản ứng PCR được thiết lập với tổng thể tích 20 µL bao gồm các thành phần: 0,4 µM mỗi mỗi, 4 µL 5X Mytaq

reaction buffer (Bioline, Mĩ), 0,2 μL MyTaq DNA polymerase (Bioline, Mĩ), lượng nước sinh học phân tử vừa đủ và 1 μL của DNA tách chiết có nồng độ 3,1 ng/ μL . Phản ứng PCR được thiết lập trong máy PCR 3PrimeG (Techne, Anh) theo chu trình luân nhiệt với các bước biến tính ở 95 $^{\circ}\text{C}$, giai đoạn mỗi bắt cặp với trình tự mạch khuôn ở 58 $^{\circ}\text{C}$ và giai đoạn kéo dài mỗi ở 72 $^{\circ}\text{C}$. Sản phẩm PCR được phát hiện bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,5 %.

2.4 Thiết lập phản ứng RPA

Phản ứng RPA được thiết lập theo qui trình được cung cấp bởi TwistDx (Cambridge, Mĩ). 50 μL hỗn hợp phản ứng được chuẩn bị trong ống 0,2 mL với 2,4 μL mỗi mỗi loại ở nồng độ 10 μM , 29,5 μL đệm hoàn nguyên, 1 μL của DNA tách chiết ở nồng độ 3,1 ng/ μL , 2,5 μL magnesium acetate và lượng nước sinh học phân tử vừa đủ. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được chuyển vào ống chứa thành phần đông khô, trộn đều và ủ các ống phản ứng trong máy ủ nhiệt khô CHB-350T (Jeiotech, Hàn Quốc) tại nhiệt độ 39 $^{\circ}\text{C}$ trong 25 phút theo qui trình ban đầu của hãng sản xuất. Sau khi kết thúc phản ứng, bổ sung 50 μL PCI vào tube, vortex và li tâm 14.000 vòng/phút trong 5 phút, thu dịch nổi và điện di trên gel agarose 1,5 %.

2.5 Khảo sát nhiệt độ và thời gian cho phản ứng RPA

Để xác định được nhiệt độ và thời gian mà phản ứng RPA hiệu quả nhất, các phản ứng được khảo sát ở các nhiệt độ (35, 37, 39, 41) $^{\circ}\text{C}$ trong các khoảng thời gian (15, 20, 25 và 30) phút. Các nhiệt độ và mốc thời gian khảo sát nằm trong khoảng giá trị khuyến cáo từ nhà sản xuất TwistDx kết hợp với kết quả khảo sát từ các nghiên cứu đã sử dụng RPA trước đó. Kết quả khảo sát được quan sát trên bảng điện di gel agarose 1,5 %.

Bảng 1. Trình tự mỗi RPA được sử dụng trong nghiên cứu

| STT | Tên mỗi | Trình tự Nucleotide |
|-----|---------------|----------------------------------|
| 1 | <i>hly</i> -F | CCCATTAGGCGGAAAAGCATATTCGCTTAATA |
| 2 | <i>hly</i> -R | CCTGCTTCTAGTTGTTGGTACAATGACATCG |

Phản ứng RPA và PCR được thiết lập sử dụng 1 μL DNA đã tách chiết với nồng độ 3,1 ng/ μL làm vật liệu khuôn. Kết quả điện di sản phẩm của các phản ứng trên gel agarose cho thấy phản ứng RPA tạo ra sản phẩm là một băng duy nhất, có kích thước tương đồng với kích thước sản phẩm PCR và phù hợp với kích thước sản phẩm dự kiến là 228 bp. Như vậy, cặp mỗi đã thiết kế đã khuếch đại thành công trình tự *hly* trên hệ gen của vi khuẩn *L. monocytogenes* bằng cả hai phương pháp PCR và RPA.

3.2 Nhiệt độ và thời gian tối ưu cho phản ứng RPA

Kết quả khảo sát điều kiện nhiệt độ cho thấy ở tất cả các nhiệt độ khảo sát, phản ứng RPA đều cho sản phẩm khuếch

2.6 Phân tích độ đặc hiệu của phản ứng RPA

DNA đã tách chiết của các chủng vi khuẩn *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, và *Vibrio parahaemolyticus* được sử dụng làm vật liệu khuôn để khảo sát độ đặc hiệu của phản ứng RPA phát hiện gen *hly* trên hệ gen của *L. monocytogenes*. Phản ứng được thực hiện dưới các điều kiện nhiệt độ và thời gian đã khảo sát ở trên. Kết quả được kết luận là dương tính khi có sản phẩm khuếch đại được tạo ra khi điện di trên gel agarose.

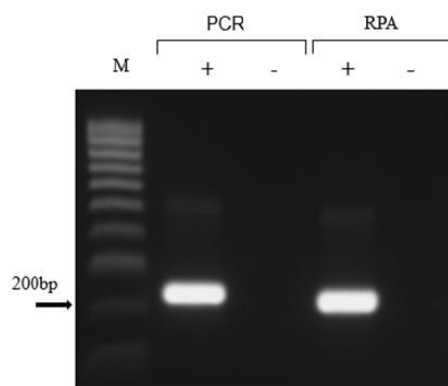
2.7 Giới hạn phát hiện DNA tách chiết của phản ứng RPA

DNA tách chiết được pha loãng trong nước sinh học phân tử theo cấp thập phân với nồng độ DNA giảm dần từ 310 ng/ μL đến 3,1 fg/ μL . 1 μL của mẫu ở mỗi nồng độ pha loãng được sử dụng làm lượng mẫu cho phản ứng RPA để xác định giới hạn phát hiện DNA tách chiết của phản ứng RPA đã thiết lập. Thí nghiệm tương tự cũng được thiết lập cho phản ứng PCR, từ đó đánh giá được độ nhạy của RPA so với PCR trong cùng nghiên cứu.

3 Kết quả

3.1 Xây dựng phản ứng RPA phát hiện DNA *L. monocytogenes*

Mỗi RPA được thiết kế để phát hiện gen *hly* của vi khuẩn *L. monocytogenes*. *Hly* là vùng gen mã hóa cho nhân tố độc lực quan trọng Listeriolysin O của vi khuẩn *L. monocytogenes*, giúp chúng xâm nhiễm, tồn tại và nhân lên bên trong tế bào chủ [21]. Mỗi sau khi thiết kế được kiểm tra bằng phần mềm NCBI Blast cho thấy các mỗi chỉ bắt cặp với trình tự gen *hly* của vi khuẩn *L. monocytogenes*, đạt yêu cầu để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Trình tự mỗi được liệt kê ở Bảng 1.

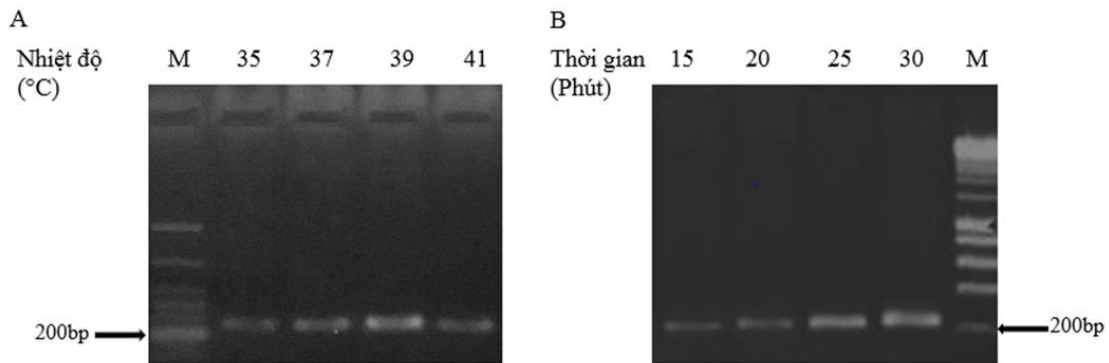


Hình 1 Phản ứng PCR và RPA sử dụng cặp mỗi đặc hiệu nhân bản gen *hly* của *L. monocytogenes*. (+) Phản ứng dương tính với DNA tách chiết từ vi khuẩn *L. monocytogenes* sử dụng bộ mỗi đã thiết kế. (-) Phản ứng sử dụng bộ mỗi đã thiết kế âm tính với mẫu đối chứng âm là mẫu nước không chứa DNA tách chiết của vi khuẩn *L. monocytogenes*. M: Thang 25 bp.

đại trình tự mục tiêu với hình ảnh điện di là một băng duy nhất, không có sản phẩm kí sinh (Hình 2A). Tuy nhiên, ở (35, 37 và 41) $^{\circ}\text{C}$, băng sản phẩm điện di mờ, ở 39 $^{\circ}\text{C}$ băng

xuất hiện sáng và rõ ràng nhất, chứng tỏ 39 °C là nhiệt độ phản ứng RPA hoạt động hiệu quả nhất. Các khảo sát về thời gian cho phản ứng RPA được thực hiện ở nhiệt độ 39 °C. Ở các mốc thời gian ngắn từ 15 đến 20 phút, phản ứng đã có thể tạo ra sản phẩm khuếch đại

DNA với hình ảnh các băng điện di mờ trên bản gel (Hình 2B). Từ 25 phút trở đi, băng điện di cho kết quả sáng và rõ nhất. Do đó, trong nghiên cứu này, thời gian thích hợp cho phản ứng RPA phát hiện hiệu quả gen *hly* trên hệ gen của *L. monocytogenes* là 25 phút.



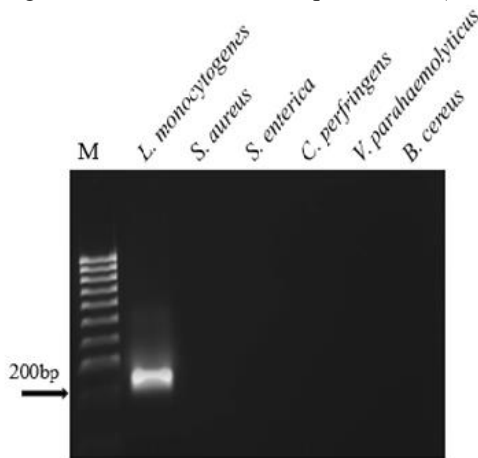
Hình 2 Kết quả khảo sát nhiệt độ và thời gian của phản ứng RPA nhân bản gen *hly* của *L. monocytogenes*.
 (A) Khảo sát phản ứng RPA nhân bản gen *hly* ở các nhiệt độ (35, 37, 39 và 41) °C.
 (B) Khảo sát phản ứng RPA nhân bản gen *hly* ở 39 °C trong các khoảng thời gian 15, 20, 25, 30 phút. M: Thang 1 kb.

3.3 Độ đặc hiệu của phản ứng RPA phát hiện *L. Monocytogenes*
 Kết quả đánh giá độ đặc hiệu cho thấy chỉ có phản ứng RPA với cặp mồi đã thiết kế, sử dụng DNA tách chiết từ vi khuẩn *L. monocytogenes* làm vật liệu khuôn cho kết quả dương tính, trong khi phản ứng RPA sử dụng DNA của các chủng vi khuẩn còn lại cho kết quả âm tính (Hình 3).

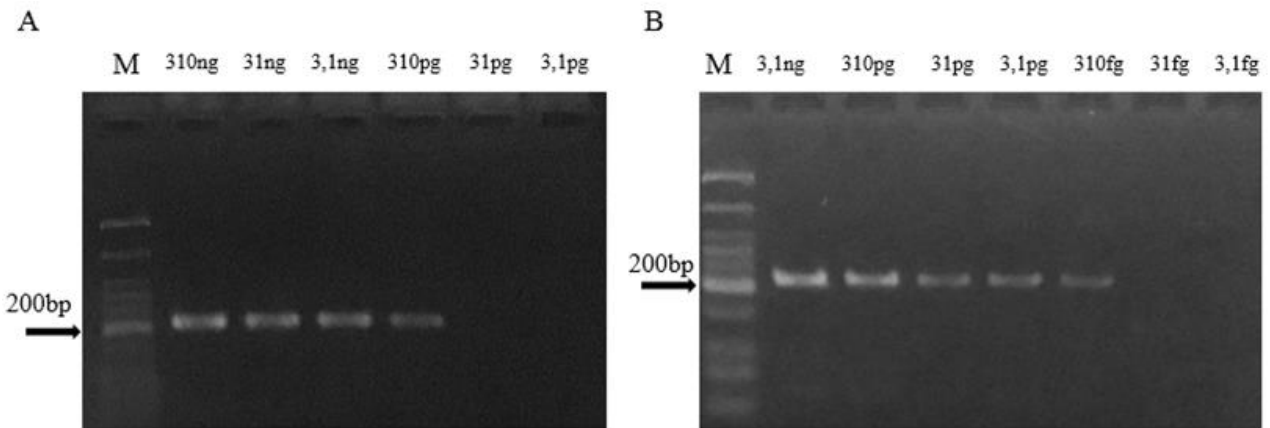
Vì vậy, không xảy ra phản ứng chéo giữa DNA của vi khuẩn *L. monocytogenes* và các chủng vi khuẩn khác được kiểm tra, đồng nghĩa với phản ứng RPA đã xây dựng đặc hiệu cho phát hiện DNA của *L. monocytogenes*, kết quả tương đồng với kết quả của nghiên cứu trước [22].

3.4 Giới hạn phát hiện của phản ứng RPA phát hiện DNA của *L. Monocytogenes*

Giới hạn phát hiện của phương pháp RPA phát hiện DNA của *L. monocytogenes* được đánh giá dựa trên phân tích kết quả điện di ở Hình 4: Với nồng độ DNA pha loãng từ 3,1 ng/μL đến 310 fg/μL, phản ứng dương tính và độ sáng của các băng điện di giảm dần, tỉ lệ thuận với độ giảm của dãy pha loãng nồng độ DNA, từ nồng độ DNA 31 fg/μL, không còn sản phẩm của phản ứng RPA xuất hiện (Hình 4B). Trong khi đó phản ứng PCR sử dụng cùng lượng DNA tách chiết chỉ cho kết quả phát hiện từ 310 ng/μL đến 310 pg/μL (Hình 4A). Do đó, nồng độ DNA tách chiết của vi khuẩn *L. monocytogenes* tối thiểu mà phản ứng RPA có thể phát hiện được là 310 fg/μL. Giới hạn phát hiện của phản ứng RPA nhỏ hơn 1.000 lần giới hạn phát hiện của phản ứng PCR sử dụng chung bộ mồi đã thiết kế đặc hiệu cho gen *hly* của *L. monocytogenes*. Từ đó, chứng tỏ cặp mồi được sử dụng có độ nhạy cao, bắt cặp và khuếch đại đoạn gen mong muốn ngay cả khi nồng độ DNA mạch khuôn rất thấp.



Hình 3 Kết quả xác định độ đặc hiệu của phản ứng RPA nhân bản gen *hly* của vi khuẩn *L. monocytogenes* với DNA các chủng vi khuẩn khác bao gồm *S. aureus*, *S. enterica*, *C. perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus* và *Bacillus cereus*.
 M: thang 1 kb.



Hình 4. Giới hạn phát hiện của phản ứng RPA so với giới hạn phát hiện của phản ứng PCR sử dụng chung bộ mồi đặc hiệu cho gen *hly* trên hệ gen của *L. monocytogenes*. (A) Giới hạn phát hiện DNA của vi khuẩn *L. monocytogenes* bằng phản ứng PCR sử dụng 1 μ L của DNA pha loãng từ 310 ng đến 3,1 pg. (B) Giới hạn phát hiện DNA của vi khuẩn *L. monocytogenes* bằng phản ứng RPA sử dụng 1 μ L của DNA pha loãng từ 3,1 ng đến 3,1 fg. M: Thang 25 bp.

4 Bàn luận

Listeria monocytogenes là tác nhân gây ngộ độc thực phẩm nguy hiểm và gây bệnh nhiễm khuẩn Listeria, có thể dẫn đến tử vong cho người nhiễm khuẩn. Để kịp thời ngăn chặn những hậu quả nghiêm trọng của nhiễm khuẩn *L. monocytogenes*, cần phát triển một phương pháp phát hiện nhanh chóng và hiệu quả. Hiện nay, RPA là một trong những Kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt phổ biến đã được nghiên cứu ứng dụng trong phát hiện các mầm bệnh vi sinh vật. Trong nghiên cứu này, phương pháp RPA được xây dựng đã phát hiện hiệu quả gen *hly* của *L. monocytogenes*.

Khi sử dụng phương pháp RPA để phát hiện nhanh *L. monocytogenes*, thời gian xét nghiệm ngắn rất quan trọng. Nghiên cứu đã đánh giá thời gian tối ưu để phản ứng RPA phát hiện DNA *L. monocytogenes* tách chiết hiệu quả là 25 phút, phản ứng được thiết lập tại một nhiệt độ ủ ổn định 39 °C, rút ngắn thời gian đáng kể so với các phương pháp phát hiện truyền thống. So với phương pháp nuôi cấy, phân lập vi sinh thường mất (3-5) ngày để đưa ra kết quả cuối cùng hay phương pháp Real-time PCR cần tối đa 36 giờ để thực hiện và đọc kết quả thì phương pháp RPA mang lại lợi ích vượt trội về tiết kiệm thời gian. Các nghiên cứu trước đây của Charbel Eid và Juan G. Santiago (2016), Xin-jun Du và cộng sự (2018) cũng cho kết luận tương tự về ưu điểm này của phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt RPA [22,23]. So với các phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt khác như LAMP, phương pháp khuếch đại mồi chéo CPA (Cross-priming amplification) nhân bản DNA của *L. monocytogenes*, RPA là phương pháp tiết kiệm thời gian nhất [24,25]. Ngoài ra, RPA được thiết lập ở một nhiệt độ không đổi 39 °C nên không yêu cầu thiết bị ủ nhiệt chuyên dụng, đắt tiền như máy PCR, hơn nữa, giá thành cho một phản ứng RPA khoảng 4,3 USD, là mức chi phí phù hợp cho một xét nghiệm lâm sàng. Do đó, sử dụng

phương pháp RPA phát hiện DNA của vi khuẩn *L. monocytogenes* hiệu quả trong tiết kiệm cả thời gian và chi phí.

Kết quả này cũng chỉ ra RPA có độ đặc hiệu cao vì phản ứng RPA với bộ mồi đã thiết kế chỉ nhân bản gen *hly* của *L. monocytogenes*, phản ứng không khuếch đại trình tự DNA của một số vi khuẩn khác thuộc cùng nhóm vi khuẩn gây nhiễm phổ biến trên thực phẩm. Bên cạnh đó, RPA đã được chứng minh nhạy hơn so với xét nghiệm PCR trong cùng nghiên cứu. Giới hạn phát hiện DNA của vi khuẩn *L. monocytogenes* bằng phương pháp RPA là 310 fg, thấp hơn khoảng 1.000 lần so với giới hạn phát hiện của PCR. Kết quả này tương tự với kết quả từ nghiên cứu trước đó, các thử nghiệm RPA đều thành công trong việc phát hiện DNA của vi khuẩn mục tiêu ở nồng độ rất thấp so với phương pháp PCR truyền thống [22].

So với các phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt khác như LAMP, CPA áp dụng trên cùng đối tượng nghiên cứu là vật liệu di truyền của vi khuẩn *L. monocytogenes*, qui trình RPA được xây dựng trong nghiên cứu này có ngưỡng phát hiện thấp hơn và thời gian thực hiện ngắn hơn đáng kể. Trong khi thử nghiệm RPA cần 25 phút ủ để phản ứng cho kết quả quan sát được trên bảng điện di thì LAMP và CPA cần tối thiểu 60 đến 70 phút cho bước ủ. Ngoài ra, bước thiết kế mồi ở phương pháp RPA đơn giản và tiết kiệm thời gian hơn ở các phương pháp nhân bản đẳng nhiệt khác. RPA chỉ cần hai mồi thiết kế đặc hiệu để nhân bản gen mục tiêu, trong khi đó LAMP cần thiết kế từ (4 – 6) mồi đặc hiệu cho 6 vùng gen trên trình tự mục tiêu và CPA yêu cầu 5 mồi bắt cặp đặc hiệu với 5 vùng gen trên trình tự mục tiêu [24,25]. Do đó, RPA nhanh và đơn giản hơn so với các phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt khác khi ứng dụng nhân bản vật liệu di truyền của vi khuẩn *L. monocytogenes*.

Tóm lại, đây là nghiên cứu đầu tiên sử dụng phương pháp RPA để phát hiện nhanh vật liệu di truyền của vi khuẩn *L. monocytogenes* tại Việt Nam. Quy trình thực hiện kỹ thuật RPA nhanh, đơn giản, không yêu cầu kỹ thuật viên có kinh nghiệm. Phương pháp có thể phát hiện nhanh và chính xác trình tự mục tiêu trên hệ gen của vi khuẩn *L. monocytogenes*, có thể thay thế các phương pháp phát hiện truyền thống. RPA có tiềm năng trở thành một công cụ phát

hiện hiệu quả vi khuẩn *L. monocytogenes* và có giá trị ứng dụng thực tiễn khi khả năng phát hiện trực tiếp tế bào vi khuẩn *L. monocytogenes* trong mẫu lâm sàng được đánh giá kỹ càng.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, mã số đề tài: 2020.01.015/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. Carvalho F, Sousa S, Cabanes D. *How Listeria monocytogenes organizes its surface for virulence*. Front Cell Infect Microbiol. 2014. 4:48.
2. Gasanov U, Hughes D, Hansbro P. *Methods for the isolation and identification of Listeria spp. and Listeria monocytogenes: A review*. FEMS Microbiol Rev. 2005. 29:851–75.
3. WHO. *Listeriosis – South Africa. 2018*. Available from: <https://www.who.int/csr/don/28-march-2018-listeriosis-south-africa/en/>
4. Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP, et al. *Listeria - Review of epidemiology and pathogenesis*. J Microbiol Immunol Infect. 2007. 40(1):4–13.
5. Chau TTH, Campbell JI, Schultsz C, van Vinh Chau N, Diep TS, Baker S, et al. *Three adult cases of Listeria monocytogenes meningitis in Vietnam*. PLoS Med. 2010. 7(7).
6. Curtis GD, Lee WH. *Culture media and methods for the isolation of Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol. 1995. 26(1):1–13.
7. Taherkhani A, Attar H, MM A, Mirzaee SA, Jalali M. *Prevalence of Listeria monocytogenes in the river receiving the effluent of municipal wastewater treatment plant*. Int J Env Heal Eng. 2013. 3:37–41.
8. Swetha CS, Babu AJ, Rao TM. *Detection of Listeria monocytogenes in Milk and Ice Cream by Polymerase Chain Reaction*. STM Journals. 2016. 5(1).
9. Li W, Bai L, Fu P, Han H, Liu J, Guo Y. *The Epidemiology of Listeria monocytogenes in China*. Foodborne Pathog Dis. 2018. 15(8):459–66.
10. Craw P, Balachandran W. *Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: A critical review*. Lab Chip. 2012. 12(14):2469–86.
11. Xu G, Hu L, Zhong H, Wang H, Yusa SI, Weiss TC, et al. *Cross priming amplification: Mechanism and optimization for isothermal DNA amplification*. Sci Rep. 2012. 2:1–7.
12. Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. *DNA detection using recombination proteins*. PLoS Biol. 2006. 4(7):1115–21.
13. Liu H bin, Zang YX, Du X jun, Li P, Wang S. *Development of an isothermal amplification-based assay for the rapid visual detection of Salmonella bacteria*. J Dairy Sci. 2017. 100(9):7016–25.
14. Geng Y, Tan K, Liu L, Sun XX, Zhao B, Wang J. *Development and evaluation of a rapid and sensitive RPA assay for specific detection of Vibrio parahaemolyticus in seafood*. BMC Microbiol. 2019. 19(1):1–9.
15. Frimpong M, Ahor HS, Wahed AA El, Agbavor B, Sarpong FN, Laing K, et al. *Rapid detection of Mycobacterium ulcerans with isothermal recombinase polymerase amplification assay*. PLoS Negl Trop Dis. 2019. 13(2):1–14.
16. Rames EK, Macdonald J. *Rapid assessment of viral water quality using a novel recombinase polymerase amplification test for human adenovirus*. Appl Microbiol Biotechnol. 2019.
17. Miao F, Zhang J, Li N, Chen T, Wang L, Zhang F, et al. *Rapid and sensitive recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strip for detecting African swine fever virus*. Front Microbiol. 2019. 10(5):1–7.
18. Ngọc N, Huy B, Đăng QQ, Chương NH, Đại T, Hồ TP, et al. *Xây dựng qui trình phát hiện đồng thời Plasmodium falciparum và Plasmodium vivax dựa trên kỹ thuật recombinase polymerase amplification*. 2018. 60(12):7–13.
19. Nguy M. *Kỹ thuật mới trong chẩn đoán bệnh hại cây trồng*. Tạp chí Khoa học & Công nghệ Việt Nam. 2018. 61–4.
20. Daher R. *Recombinase polymerase amplification technology: Assessment for nucleic acid- based point-of-care diagnostics*. 2015. Available from: <https://corpus.ulaval.ca/jspui/bitstream/20.500.11794/26269/1/31954.pdf>

21. Le Monnier A, Abachin E, Beretti JL, Berche P, Kayal S. *Diagnosis of Listeria monocytogenes meningoenzephalitis by real-time PCR for the hly gene*. J Clin Microbiol. 2011. 49(11):3917–23.
22. Du XJ, Zang YX, Liu H Bin, Li P, Wang S. *Recombinase Polymerase Amplification Combined with Lateral Flow Strip for Listeria monocytogenes Detection in Food*. J Food Sci. 2018. 83(4):1041–7.
23. Eid C, Santiago JG. *Assay for: Listeria monocytogenes cells in whole blood using isotachopheresis and recombinase polymerase amplification*. Analyst. 2017. 142(1):48–54.
24. Wang Y, Wang Y, Ma A, Li D, Ye C. *Rapid and sensitive detection of Listeria monocytogenes by cross-priming amplification of lmo0733 gene*. FEMS Microbiol Lett. 2014. 361(1):43–51.
25. Tang MJ, Zhou S, Zhang XY, Pu JH, Ge QL, Tang XJ, et al. *Rapid and sensitive detection of Listeria monocytogenes by loop-mediated isothermal amplification*. Curr Microbiol. 2011. 63(6): 511–6.

Development of isothermal amplification based Recombinase Polymerase Amplification (RPA) assay for rapid detection of *hly* gene of *Listeria monocytogenes*

Hau Thi Tran^{*}, Diem Hong Tran, Huong Thi Thu Phung
NTT Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University, HCMC, Vietnam
^{*}tthau@ntt.edu.vn

Abstract *Listeria monocytogenes* is one of the most common agents of food poisoning which can cause serious foodborne diseases or even lethality. *L. monocytogenes* can be detected using traditional microbiology or molecular biology techniques, notably PCR. However, the application of these methods for detecting *L. monocytogenes* is limited due to the time-consuming, and strict requirement of equipment and skilled personnel. In this study, Recombinase polymerase amplification (RPA), an isothermal amplification method was established to rapidly and specifically detect *hly* gene from *L. monocytogenes*. Results showed that the *hly* gene was successfully amplified by the designed RPA primers. The method was well-performed in the optimal conditions of 39 °C within 25 minutes. The limit of RPA detection was 310 fg of genomic DNA of *L. monocytogenes*, which was 1000 - fold more sensitive than the conventional PCR. The RPA with the advantages of rapidity and sensitivity has the potential of alternating traditional methods and being developed into a rapid test kit applied for detection of *L. monocytogenes*.

Keywords *hly* gene, isothermal amplification, *Listeria monocytogenes*, Polymerase Chain Reaction, Recombinase Polymerase Amplification.