

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

ĐẶNG THỊ THU PHƯƠNG

**NGHIÊN CỨU, SÀNG LỌC VÀ THU NHẬN APTAMER ĐẶC HIỆU
KHÁNG SINH STREPTOMYCIN VÀ ỨNG DỤNG ĐỂ XÁC ĐỊNH DƯ
LƯỢNG KHÁNG SINH TRONG SỮA**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số : 60420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn: PGS.TS. LÊ QUANG HUẤN

Viện Công nghệ sinh học

Hà Nội – 12/2015

MỞ ĐẦU

Kháng sinh có vai trò quan trọng trong chăn nuôi giúp tăng hiệu quả, thúc đẩy tăng trưởng, ngăn ngừa bệnh tật. Streptomycin là một kháng sinh aminoglycoside có tác dụng diệt khuẩn bằng cách ngăn cản quá trình tổng hợp bình thường protein của vi khuẩn, thường xuyên được bổ sung vào thức ăn chăn nuôi để phòng chống bệnh cho gia súc. Phổ kháng khuẩn của streptomycin bao gồm vi khuẩn Gram âm hiếu khí và một số vi khuẩn Gram dương; streptomycin không có tác dụng với vi khuẩn yếm khí. Streptomycin có hoạt tính đặc biệt chống *M.tuberculosis* và *M.bovis*. Streptomycin cũng có hoạt tính chống một số vi khuẩn Gram dương và Gram âm hiếu khí như : *Brucella*, *Francisellatularensis*, *Yersinia pestis*, *Escherichia coli*,... Tuy nhiên bên cạnh những mặt có lợi, streptomycin cũng gây ra nhiều tác hại như gây dị ứng, rối loạn cơ quan chức năng thần kinh, thính giác, tạo máu,... Thêm vào đó, việc sử dụng streptomycin trong nông nghiệp có liên quan đến sự gia tăng hiện tượng kháng kháng sinh nguy cơ tiềm tàng tác động đến sức khỏe con người. Do đó, tồn dư kháng sinh trong môi trường và thực phẩm hiện nay đang là vấn đề rất được quan tâm

Hiện nay, có ba phương pháp chủ yếu để xác định dư lượng kháng sinh. Các phương pháp phân tích sử dụng sắc ký có ghép khối phổ như GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS, LC-MS/MS đều đáp ứng được yêu cầu và được các cơ quan thẩm quyền của các nước nhập khẩu chấp nhận. Tuy nhiên, những phương pháp này đòi hỏi đầu tư chi phí cao về thiết bị, chi phí vận hành, kỹ năng và trình độ của kiểm nghiệm viên. Do vậy, nó không phù hợp với các phòng kiểm nghiệm quy mô nhỏ hay những phòng kiểm nghiệm của địa phương. Vài năm gần đây, cách tiếp cận mới về phương pháp phân tích dựa trên phản ứng giữa kháng nguyên-kháng thể (enzyme linked immunosorbent assay ELISA) đã trở thành một công cụ khá hữu hiệu và được cơ quan thẩm quyền chấp thuận cho phép sử dụng với mục đích thử nghiệm sàng lọc (Screening method). Liên minh châu Âu (quyết định

657/EC/2002) cho phép sử dụng phương pháp ELISA trong phân tích dư lượng các chất kháng sinh cấm, tuy nhiên có những yêu cầu rất khắt khe về giới hạn phát hiện và độ không đảm bảo đo, các tỷ lệ dương tính giả và âm tính giả của xét nghiệm. Một trong các phương pháp hiện nay đang được tập trung nghiên cứu để xác định dư lượng kháng sinh là phương pháp aptasensor (sử dụng aptamer tham gia cấu tạo sensor) điện hóa.

Aptamer là các oligonucleotide (các acid ribonucleic, RNA và các sợi đơn của acid deoxyribonucleic, ssDNA) hoặc là các phân tử peptide có cấu hình không gian đặc trưng và có khả năng nhận biết và gắn kết với các phân tử đích tương đương kháng thể đơn dòng. Aptamer đã trở thành lớp chất có nhiều tiềm năng và hy vọng nhất để tạo KIT chẩn đoán và thuốc điều trị hướng đích,.. Với những ưu điểm vượt trội, chúng tôi tiến hành nghiên cứu khả năng sử dụng aptamer đặc hiệu kháng sinh streptomycin nhằm tạo KIT xác định nhanh kháng sinh này trong thực phẩm.

Aptasensor là một Biosensor, một thiết bị phân tích có khả năng chuyển một tín hiệu sinh học thành một tín hiệu quang hoặc tín hiệu điện. Đối với aptasensor điện hóa bao gồm các yếu tố thành phần: (1) Phần nhận biết sinh học đối với aptasensor là aptamer; (2) Phần chuyển đổi và khuếch đại tín hiệu nhận biết thành tín hiệu điện có thể định lượng; (3) Phần xác định cường độ tín hiệu điện. Từ kết quả liên quan tới tín hiệu điện có thể suy ra lượng chất phân tích cần xác định. Biosensor theo nguyên lý điện hóa hoạt động theo nguyên lý chuyển hóa trực tiếp một hiện tượng sinh học thành tín hiệu điện để có thể đo được bằng các thiết bị điện.

Trong khuôn khổ luận văn, chúng tôi tiến hành đề tài:

“nghiên cứu sàng lọc và thu nhận aptamer đặc hiệu kháng sinh streptomycin và ứng dụng để xác định dư lượng kháng sinh trong sữa”

Mục tiêu đề tài :

- Xây dựng được quy trình sàng lọc các aptamer (có bản chất DNA) có khả năng nhận biết và gắn kết đặc hiệu với kháng sinh streptomycin.
- Tách dòng và chọn dòng các aptamer gắn kết đặc hiệu với kháng sinh streptomycin
- Xác định trình tự và xây dựng cấu trúc bậc 2 của các aptamer thu nhận được
- Xây dựng quy trình ELISA phát hiện dư lượng streptomycin trong sữa

Nội dung nghiên cứu:

- Chuẩn bị thư viện DNA có độ đa dạng khoảng 10^{15} phân tử
- Sàng lọc Aptamer đặc hiệu với kháng sinh streptomycin
- Tách dòng và chọn dòng các aptamer thu được có ái lực cao với kháng sinh đích
- Sử dụng phương pháp ELISA để phát hiện dư lượng kháng sinh streptomycin

CHƯƠNG I : TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về streptomycin

1.1.1. Kháng sinh streptomycin

Kháng sinh còn được gọi là trụ sinh là những chất có khả năng tiêu diệt vi khuẩn hay kìm hãm sự phát triển của vi khuẩn một cách đặc hiệu. Nó có tác dụng lên vi khuẩn ở cấp độ phân tử, thường là một vị trí quan trọng của vi khuẩn hay một phản ứng trong quá trình phát triển của vi khuẩn.

Từ “antibiotics” (kháng sinh) có nguồn gốc từ chữ “antibiosis”. “anti” có nghĩa là “chống lại” và “biosis” có nghĩa là “cuộc sống”. Chất kháng sinh tác động, chống lại một số loại vi khuẩn. Thật vậy, chất kháng sinh là chất hoá học lấy từ cơ thể các vi sinh vật như vi khuẩn, nấm mốc, hoặc một vài thực vật.

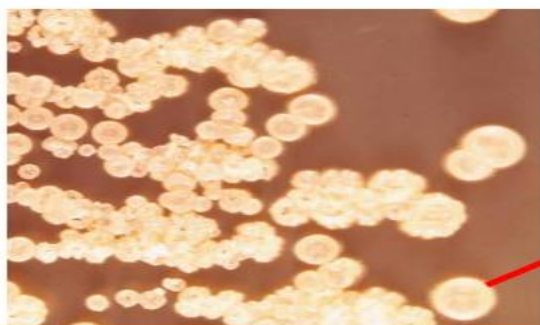
Streptomycin là aminoglycoside đầu tiên được sản xuất thương mại và được phân lập từ chủng *Streptomyces griseus* năm 1944 và sử dụng rất hiệu quả trong điều trị bệnh lao.

Các streptomycin đều tạo muối với acid vô cơ. Các loại muối kháng sinh thường gặp là sunfat, clohydrat, photphat và có cả phức canxi clorua của streptomycin clohydrat. Các muối này hoà tan trong nước, hầu như không tan trong clorofooc, cồn và ethel.

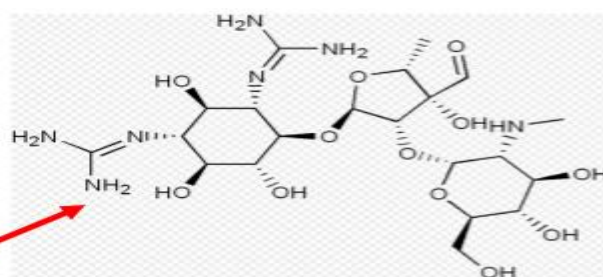
Tên quốc tế : Streptomycine

Loại thuốc: kháng sinh nhóm aminoglycoside

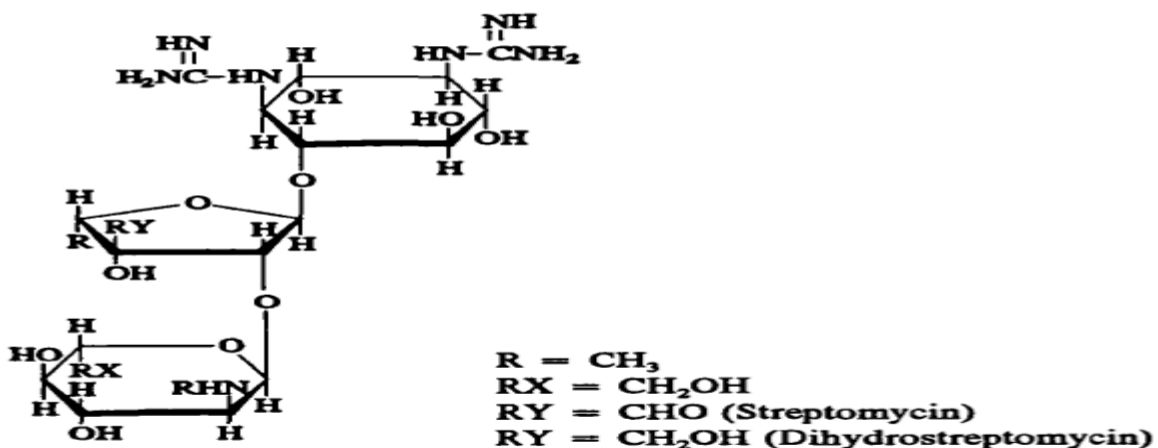
Streptomycin là kháng sinh nhóm aminoglycosid có tác dụng diệt khuẩn bằng cách ngăn cản quá trình tổng hợp bình thường protein của vi khuẩn



Streptomyces griseus.



Streptomycin



Hình 1.1. Cấu trúc streptomycin và dihydrostreptomycin

Họ thuốc	Chất hoạt động	n	Họ thuốc	Chất hoạt động	n
penicillins	amoxicillin	7	tetracyclines	chlortetracycline	6
	ampicillin	4		oxytetracycline	6
	benzylpenicillin	9	aminoglycosides	dihydrostreptomycin	3
	cloxacillin	7		gentamycin	1
	nafcillin	2		kanamycin	1
	penethamate	2		neomycin	3
				streptomycin	2

Bảng 1.1 Phân loại (n : loại nhóm) các hợp chất hoạt động có trong thuốc thú y được đăng ký ở Bỉ áp dụng để quản lý quá trình sản xuất sữa bò. (5/8/2010 - Anon.)

Trong thú y thường dùng streptomycin sulfat. Trong đó hàm lượng Dihydro streptomycin chiếm 79,87%.

- Tác dụng:

Tác dụng trên các cầu khuẩn gram (+) kháng penicilin, tụ cầu khuẩn, đống dậu, nhiệt thán, phế cầu, liên cầu (có tác dụng hiệp đồng với kháng sinh nhóm β lactam)

Tác dụng chủ yếu đối với vi khuẩn gram (-). Đặc biệt nhạy cảm là: vi khuẩn tụ huyết trùng, *E.coli*, *shigella* (ly), *pseudomonas*, *salmonella* (vi khuẩn thương hàn), *Haemophilus*, *Brucella*.

Đặc biệt tác dụng đối với trực khuẩn lao, *brucella* và các xoắn khuẩn (*leptospira*)

Vi khuẩn kháng streptomycin: khuẩn kỵ khí, trực khuẩn mũ xanh và 1 số nấm bệnh.

Hấp thu nhanh qua mao mạch và thải trừ qua thận sau khi tiêm nồng độ streptomycin cao nhất trong máu vào giờ thứ 2. Thải trừ nhanh qua thận 50-70% và sau 12 giờ thải trừ hết.

Ứng dụng điều trị: Người ta thường kết hợp streptomycin với các sulfamid hay với các thuốc khác để trị các bệnh viêm nhiễm do vi khuẩn gây ra. Theo chỉ thị mới nhất của bộ Y tế, hiện nay không dùng streptomycin cho đường tiêu hóa.

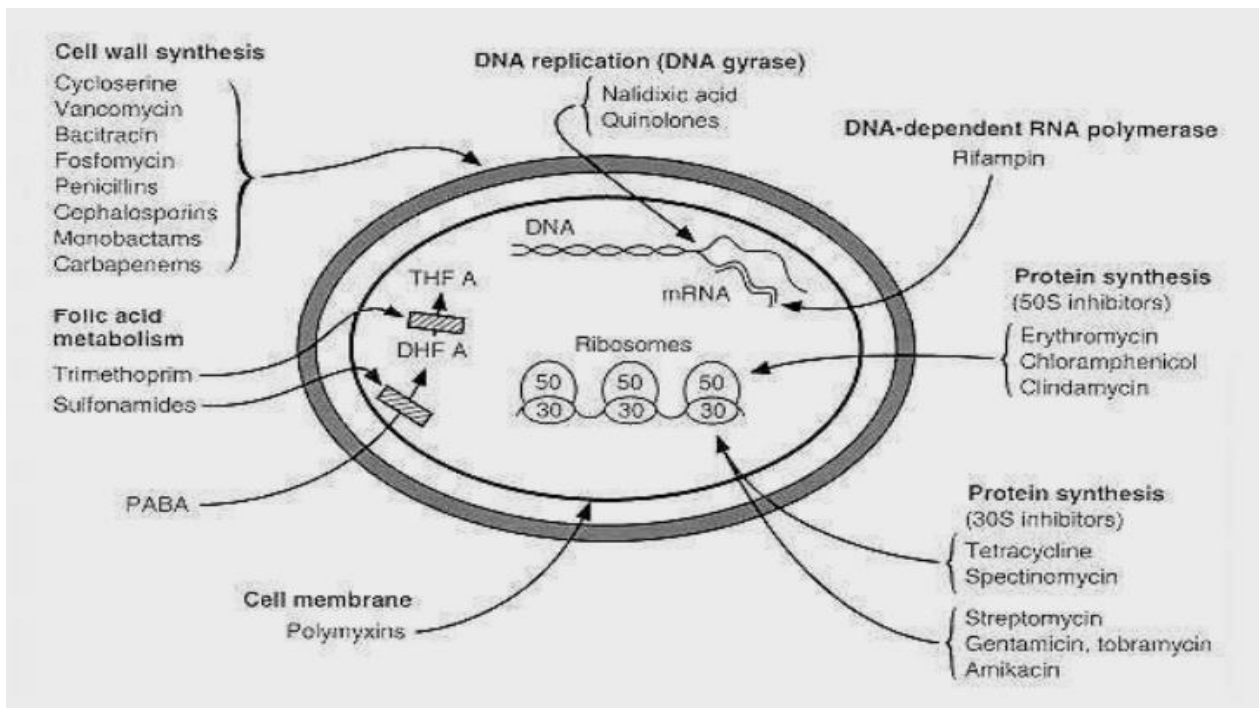
Streptomycin gây ra phản ứng mẫn cảm ở da thường xuất hiện vào tuần thứ 2 và 3. Hết sức thận trọng để chọn liều thích hợp với người bệnh suy thận. Với người tăng ure huyết trầm trọng, một liều đơn có thể tạo nồng độ thuốc cao trong máu vài ngày và có thể tích lũy gây độc trên tai. Khi điều trị dài ngày bằng Streptomycin, kiểm hoá nước tiểu có thể giảm thiểu hoặc ngăn ngừa kích ứng thận. Trẻ em không được dùng Streptomycin vượt quá liều đã khuyến cáo vì đã gặp hội chứng ức chế thần kinh trung ương ở trẻ dùng quá liều.[2,3,12,13]

Kháng sinh streptomycin và đồng phân của nó, dihydrostreptomycin được sử dụng rộng rãi để điều trị các bệnh nhiễm khuẩn ở gia súc, cừu, lợn và gia cầm. Chúng là nhóm aminoglycoside chủ yếu hoạt động chống lại các vi khuẩn gram âm và tác động chủ yếu vào quá trình tổng hợp protein của vi khuẩn qua việc gắn vào các ribosome nhân sơ. Các chủng mẫn cảm gồm *Actinomyces bovis*, *Pasturella spp.*, *E.coli*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter fetus*, *Leptospira spp.*, và *Brucella spp.*, *Mycobacterium tuberculosis*. Streptomycin cũng được sử dụng để trị các bệnh do vi khuẩn ở ong mật, như bệnh *European foulbrood* gây ra bởi *Melissococcus pluton*, *Streptococcus apis* và *Bacillus olvei*.

Mục đích sử dụng khác của streptomycin là kiểm soát Fireblight, một bệnh tàn phá do vi khuẩn, gây ra bởi *Erwinia amylovora*, ảnh hưởng đến cây ăn quả trong mùa ra hoa.[18]

1.1.2. Cơ chế tác động của kháng sinh streptomycin lên vi khuẩn

Streptomycin là thuốc diệt khuẩn, ức chế sự tổng hợp protein của vi khuẩn ở mức ribosom. Streptomycin gắn đặc hiệu vào tiểu phần 30s của ribosom ở vị trí P₁₀. Do vậy, mã bị đọc sai, gây tổng hợp và tích lũy protein sai lạc, kìm hãm vi khuẩn phát triển. Streptomycin gây rối loạn cả quá trình tổng hợp khâu khởi đầu, kéo dài đến kết thúc, do có thể những P₈ và P₁₁... cũng gắn vào Streptomycin. Ngoài ra còn có cơ chế khác như: thay đổi tính thấm màng, hô hấp tế bào, đến DNA của vi khuẩn.



Hình 1.2. Kháng sinh tác động đến sự tổng hợp protein

1.1.3. Kháng sinh trong chăn nuôi

1.1.3.1. Tác dụng của việc sử dụng kháng sinh trong thức ăn chăn nuôi

Trong chăn nuôi hiện nay, vấn đề sử dụng thuốc kháng sinh là rất phổ biến. Nó được sử dụng với 3 mục đích: điều trị bệnh, phòng bệnh và dùng như chất kích thích sinh trưởng đem lại những lợi ích sau:

- Tăng năng suất sinh trưởng và sinh sản ở gia súc, gia cầm
- Tăng hiệu quả sử dụng thức ăn, làm cho vật nuôi thích ứng nhanh chóng với sự thay đổi bất thường về cơ cấu và chủng loại nguyên liệu trong khẩu phần ăn.
- Nâng cao chất lượng sản phẩm (giảm tỷ lệ thịt mỡ, tăng tỷ lệ thịt nạc, làm cho thịt trở nên mềm hơn và không nhiễm mầm bệnh
- Phòng các bệnh mạn tính và ngăn chặn xảy ra những dịch bệnh do vi trùng
- Tăng hiệu quả kinh tế trong chăn nuôi [16]

Thuốc kháng sinh đã được sử dụng trong ngành công nghiệp sữa trong hơn 5 thập kỷ. Chúng được dùng chủ yếu để điều trị các bệnh lây nhiễm ở bầu vú (bò, cừu,...), và cũng được dùng để điều trị các bệnh khác (STEAD et al. 2008). Sự điều trị cho kháng khuẩn cho những động vật tiết sữa có thể dẫn đến sự tồn dư thuốc trong sản phẩm sữa. Sự tồn tại của dư lượng kháng sinh trong thành phần sữa là mối nguy hại tiềm ẩn đối với người tiêu dùng vì các phản ứng dị ứng, ảnh hưởng xấu cho đường ruột và nguy cơ kháng khuẩn trong cộng đồng (LINGE et al. 2007). Những thiệt hại lớn về kinh tế cũng xuất hiện trong các sản phẩm lên men do sự kìm hãm hoạt động của vi khuẩn (ALTHAU et al. 2003). Bởi dư lượng kháng sinh trong các sản phẩm có nguồn gốc động vật đặt ra mối nguy tiềm ẩn cho người tiêu dùng, theo quy định của châu Âu the Commission Regulation No.37/2010 quy định các giới hạn (MRL) cho các sản phẩm thực phẩm có nguồn gốc động vật. MRL là nồng độ tối đa dư lượng của một chất có hoạt tính dược học được cho phép tồn tại trong thực phẩm. Dư lượng thuốc trong thực phẩm được kiểm soát và điều chỉnh theo the Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996, về định lượng các chất trong động vật sống và sản phẩm từ động vật

1.1.3.2. Tình hình sử dụng kháng sinh trong thức ăn chăn nuôi ở một số quốc gia

*** Trên thế giới**

ở Mỹ, hàng năm có khoảng 6 triệu pao (xấp xỉ 2730 tấn) kháng sinh được dùng trong chăn nuôi. Xấp xỉ 80% gia cầm, 70% lợn, 70% bò sữa và 60% thịt bò ở Mỹ được nuôi dưỡng bằng thức ăn có bổ sung kháng sinh và cứ mỗi một USD chi phí cho kháng sinh dùng trong thức ăn, người chăn nuôi thu được lợi tức 2 – 4 USD.

Theo số liệu của viện Thú y Mỹ (AHI), lượng kháng sinh được sử dụng trong chăn nuôi ở Mỹ năm 1999 là khoảng 20,42 triệu pao (9270 tấn), trong đó kháng sinh nhóm ionophore và arsen chiếm nhiều nhất (47,5%), tetracycline (15,67%), penicillin (4,26%) và các loại khác (32,57%). Trong số 20,42 triệu pao, có khoảng 2,8 triệu pao (13,7%) được dùng như chất kích thích sinh trưởng.

Theo số liệu của Ghislain Follet, trong năm 1997 tổng lượng kháng sinh dùng trong nhân y và chăn nuôi ở các nước châu Âu là 10.500 tấn (quy theo mức 100% tinh khiết của các thành phần hoạt tính), trong đó 52% sử dụng trong nhân y, 33% trong điều trị thú y và 15% như chất bổ sung trong thức ăn chăn nuôi.

***Tại Việt Nam**

Theo tổng hợp việc sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi thú y ở Việt Nam – TS. Nguyễn Quốc Ân – Phó trưởng phòng Quản lý thuốc, Cục thú y, Bộ phát triển nông nghiệp và nông thôn. Kết quả khảo sát tình hình sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi ở một số trang trại chăn nuôi tập trung trên địa bàn tỉnh Hưng Yên, Hà Tây tại 30 trang trại chăn nuôi lợn thịt và 30 trang trại chăn nuôi gà thịt cho thấy:

- 100% các trang trại chăn nuôi có sử dụng kháng sinh, với mục đích chủ yếu để trị bệnh (63,3% với lợn thịt, 50% với gà thịt); với mục đích phòng và trị bệnh (13,3% với lợn thịt, 46,7% với gà thịt)
- 60,3% mẫu thức ăn chăn nuôi lợn thịt, 70,3% mẫu thức ăn chăn nuôi gà thịt phát hiện ít nhất có một trong số các loại kháng sinh thuộc nhóm tetracycline và tylosin trong đó có một mẫu thức ăn chăn nuôi lợn thịt có hàm lượng tylosin vượt giới hạn cho phép.