



## PHÁT HIỆN VI KHUẨN *Aeromonas schubertii* GÂY ĐÓM TRẮNG Ở NỘI QUAN CÁ LÓC (*Channa striata*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP PCR

Nguyễn Ngọc Dung và Đặng Thị Hoàng Oanh

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 15/05/2017

Ngày nhận bài sửa: 12/07/2017

Ngày duyệt đăng: 30/11/2017

### Title:

Detection of *Aeromonas schubertii* causing white inclusions in internal organs of snakehead fish (*Channa striata*) by using polymerase chain reaction

### Từ khóa:

*Aeromonas schubertii*, Cá lóc (*Channa striata*), PCR

### Keywords:

*Aeromonas schubertii*, PCR and snakehead fish (*Channa striata*)

### ABSTRACT

The PCR procedure to detect *Aeromonas schubertii* bacteria, which causes white inclusions in internal organs of snakehead fish, was carried out and standardized. The primer pairs *Schubertii*-16S- (UF-2) F and *Schubertii*-16S- (UF-2) R (Demarta et al., 1999) were used to amplify the 16s rDNA gene for *A. schubertii* with a 322-bp PCR product was used in order to shorten the detection time and specific to the causative agent. The optimized PCR procedure includes 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1U Taq DNA polymerase and 0.2 mM dNTPs. The detection limit of this PCR protocol is approximately of 30 ng DNA. The specificity of the primer pair is determined to detect only *A. schubertii* bacteria without detection of some common bacterial pathogens in aquaculture such as *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Edwardsiella ictaluri* and *Flavobacterium columnare*.

### TÓM TẮT

Quy trình PCR phát hiện vi khuẩn *Aeromonas schubertii* gây bệnh đốm trắng nội quan trên cá lóc được thực hiện và chuẩn hóa. Cặp mồi *Schubertii*-16S- (UF-2) F và *Schubertii*-16S- (UF-2) R (Demarta et al., 1999) được sử dụng để khuếch đại gen 16s rDNA cho vi khuẩn *A. schubertii* với kích thước sản phẩm PCR là 322 bp được thực hiện nhằm rút ngắn thời gian và phát hiện chính xác tác nhân gây bệnh. Quy trình PCR được chuẩn hóa có thành phần phản ứng là 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1U Taq DNA polymerase và 0,2 mM dNTPs, 0,25 μM mồi *Schubertii*-16S- (UF-2) F và 0,25 μM *Schubertii*-16S- (UF-2) R. Độ nhạy của quy trình PCR là 30ng DNA /phản ứng. Tính đặc hiệu của cặp mồi được xác định là chỉ phát hiện *A. schubertii* mà không phát hiện được một số loài vi khuẩn gây bệnh trong thủy sản như: *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Edwardsiella ictaluri* và *Flavobacterium columnare*.

Trích dẫn: Nguyễn Ngọc Dung và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2017. Phát hiện vi khuẩn *Aeromonas schubertii* gây đốm trắng ở nội quan cá lóc (*Channa striata*) bằng phương pháp PCR. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 53b: 32-40.

## 1 GIỚI THIỆU

Cá lóc (*Channa striata*) là đối tượng thủy sản đang được nuôi phổ biến ở các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) như An Giang, Đồng

Tháp và Trà Vinh với nhiều hình thức nuôi (như nuôi trong ao đất, nuôi trong giai, nuôi trong bể lót bạt...) và có thể nuôi với qui mô nhỏ hoặc nuôi thâm canh (Lê Xuân Sinh và Đỗ Minh Chung, 2010). Tuy nhiên, trong những năm gần đây, cùng

với việc mở rộng diện tích nuôi, đa dạng hóa các mô hình nuôi và sự thâm canh hóa của nghề nuôi cá lóc thì bệnh trên cá lóc xuất hiện ngày càng nhiều và gây thiệt hại đáng kể cho người nuôi cá lóc. Các bệnh thường gặp ở cá lóc được ghi nhận là bệnh do kí sinh trùng, bệnh xuất huyết do vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* và bệnh lở loét do nấm (Phạm Minh Đức và *ctv.*, 2012; Phạm Minh Đức và Trần Ngọc Tuấn, 2012).

Gần đây, cá lóc nuôi ở một số tỉnh như An Giang và Đồng Tháp bị bệnh với dấu hiệu bệnh lý là các đốm trắng trên các nội quan (gan, thận và lá lách) giống như các đốm trắng trên các nội quan do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây ra ở cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) (Tu Thanh Dung *et al.*, 2008). Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trọng Nghĩa (2016) xác định tác nhân gây bệnh đốm trắng trên các nội quan trên cá lóc thu ở các ao nuôi thuộc tỉnh An Giang và Đồng Tháp là vi khuẩn *Aeromonas shubertii*.

Chẩn đoán sớm tác nhân gây bệnh để có biện pháp phòng trị bệnh hiệu quả là vấn đề rất cần được nghiên cứu và ứng dụng. Phương pháp phát hiện vi khuẩn giống *Aeromonas* ở cá được sử dụng phổ biến hiện nay là phương pháp sinh hóa truyền

thông hoặc sử dụng bộ kit API 20E (BioMerieux). Cả 2 phương pháp này cần có thời gian (thường từ 3-4 ngày) để phân lập, nuôi cấy và định danh nên không đáp ứng được cho yêu cầu chẩn đoán bệnh do *A. shubertii* gây ra ở cá lóc. Phương pháp PCR hiện đang được sử dụng phổ biến hiện để phát hiện sớm các mầm bệnh vi khuẩn ở thủy sản do có độ nhạy và tính đặc hiệu cao (Lê Hữu Thời và *ctv.*, 2010; Trần Nguyễn Diễm Tú, 2011; Trần Thị Tuyết Hoa và *ctv.*, 2014). Bài báo trình bày kết quả nghiên cứu ứng dụng qui trình PCR để phát hiện vi khuẩn *A. shubertii* gây bệnh ở cá lóc nhằm giúp chẩn đoán nhanh và đặc hiệu mầm bệnh, giảm chi phí phân tích, hạn chế rủi ro và tăng hiệu quả cho nghề nuôi cá lóc.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu nghiên cứu

Tổng cộng có 8 chủng vi khuẩn phân lập được từ cá lóc bệnh đốm trắng trên nội quan (Bảng 1) được sử dụng. Trong đó, chủng HNL.4.3TT được sử dụng để nghiên cứu chuẩn hóa qui trình PCR. Bảy chủng còn lại được sử dụng để kiểm tra các chỉ tiêu hình thái sinh lý và sinh hóa. Các chủng vi khuẩn được trữ ở -80°C trong môi trường tryptic soy broth (TSB, Merck) và 25% glycerol.

**Bảng 1: Danh sách các chủng vi khuẩn phân lập từ cá lóc bệnh đốm trắng nội quan chọn nghiên cứu**

STT	Chủng vi khuẩn	Nơi thu mẫu	Cơ quan phân lập	Năm thu mẫu
1	HNL 4.3TT	Hồng Ngự, Đồng Tháp	Lá lách	2014
2	HNL 6.1T	Hồng Ngự, Đồng Tháp	Thận	2014
3	TNL 4.1T	Tam Nông, Đồng Tháp	Thận	2014
4	TNL 2.3TT	Tam Nông, Đồng Tháp	Lá lách	2014
5	L.12.8T	Long Xuyên, An Giang	Thận	2014
6	L.22.3T	Long Xuyên, An Giang	Thận	2014
7	CP 3.2TT	Châu Phú, An Giang	Lá lách	2014
8	CP 4.1T	Châu Phú, An Giang	Thận	2014

Các chủng vi khuẩn được sử dụng để kiểm tra tính đặc hiệu của qui trình PCR là *Vibrio parahaemolyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella ictaluri*, *Aeromonas hydrophila* từ bộ sưu tập vi khuẩn của Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

### 2.2 Phục hồi, nuôi tăng sinh và kiểm tra hình thái, sinh lý và sinh hoá của vi khuẩn

#### Phục hồi và nuôi tăng sinh vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn (*S. agalactiae*, *A. hydrophila* và *E. ictaluri*) được phục hồi bằng cách cấy trong môi trường tryptic soy agar (TSA, Merck). Vi khuẩn *F. columnare* được phục hồi trong môi trường Cytophagar. Đối với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* có bổ sung 1,5% NaCl vào môi trường TSA (TSA<sup>+</sup>, Merck). Các đĩa thạch sau khi

cấy được giữ trong tủ ẩm ở nhiệt độ 28°C, kiểm tra vi khuẩn thuần sau 24-48 giờ. Vi khuẩn được nuôi tăng sinh từ 16-18 giờ trong 5 ml môi trường tương ứng là TSB hoặc TSB<sup>+</sup> (TSB có bổ sung 1,5% NaCl (Merck) ở nhiệt độ 28 °C.

#### Xác định các chỉ tiêu về hình thái, sinh lý và sinh hóa

Hình dạng và kích thước của vi khuẩn được xác định bằng phương pháp nhuộm Gram (Barrow and Feltham 1993). Tính di động của vi khuẩn được quan sát bằng cách nhỏ một giọt nước cất lên lam, trải đều lên lam một ít vi khuẩn, đẩy bằng lamên và quan sát bằng kính hiển vi ở vật kính 100X. Các đặc điểm sinh lý và sinh hóa được xác định dựa theo cẩm nang của Cowan và Steels (Barrow and

Feltham, 1993) và sử dụng kit API 20 Strep (BioMerieux, Pháp).

### 2.3 Giải trình tự đoạn gen 16S rDNA

**Ly trích DNA:** DNA từ vi khuẩn được trích theo phương pháp của Bartie *et al.* (2006). Vi khuẩn được nuôi tăng sinh từ 16-18 giờ trong 5 ml môi trường brain heart infusion broth (BHIB) ở nhiệt độ 28 °C, sau đó được sử dụng để ly trích DNA bằng cách cho 1,5 ml dung dịch vi khuẩn vào ống eppendorf mới và cho vào 100 µl dung dịch TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Hỗn hợp được đun nóng ở 95 °C trong 15 phút, sau đó được làm lạnh trong nước đá và ly tâm 2 phút ở vận tốc 14.000 vòng/phút để tách dung dịch DNA và trữ ở -20 °C cho đến khi sử dụng.

Hàm lượng DNA được đo bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 260 nm theo công thức: Hàm lượng DNA (µg/ml) = Giá trị đo ở 260 nm x 50 x độ pha loãng.

**Khuếch đại DNA:** Thành phần hóa chất phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen 16S rDNA: được thực hiện dựa theo qui trình của Nunan *et al.* (2003). Tổng thể tích phản ứng 50 µl gồm 1X dung dịch đệm; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTPs; 2,5 UI Taq DNA polymerase; 0,22 µM mỗi xuôi (16S rRNA F: CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTT GATCCTGGCTCAG); 0,22 µM mỗi ngược (16S rRNA R: CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTAC CTTGTTACGACTT) và 20 ng mẫu DNA. Chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 95 °C trong 2 phút; sau đó 95 °C trong 30 giây, 45 °C trong 30 giây, 72 °C trong 2 phút; lặp lại chu kỳ trên 30 lần; 45 °C trong 1 phút; 72°C trong 2 phút. Trọng lượng phân tử đoạn DNA của đoạn gen 16S rDNA cần phát hiện là 1500 bp.

**Giải trình tự:** Sản phẩm PCR gen 16S rRNA được gửi đến công ty Nam Khoa giải trình tự. Kết quả giải trình tự được so sánh bằng công cụ BLAST search trên ngân hàng gen (GenBank) của NCBI để định danh loài vi khuẩn.

### 2.4 Phương pháp PCR phát hiện vi khuẩn *Aeromonas schubertii*

**Phương pháp PCR phát hiện *A. schubertii*:** Phương pháp PCR phát hiện *A. schubertii* được thực hiện với cặp mồi Schubertii-16S- (UF-2) F: 5'-TACTGGAAACGGTAGCT-3' và Schubertii-16S- (UF-2) R: 5'-CTGGCAGGTATTAACCACCA-3' (Demarta *et al.*, 1999). Thành phần hóa chất phản ứng gồm: 0,5 X PCR buffer (5 X); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 0,1 mM dNTPs (10 mM); 0,25 µM mỗi xuôi (10 µM); 0,25 µM mỗi ngược (10 µM); 1 U Taq DNA Polymerase (5 U/µl); 1 µl DNA mẫu vi khuẩn;

14,8 µl nước. Chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 95°C trong 15 phút, sau đó 95°C trong 45 giây; 55 C trong 45 giây; 72°C trong 1 phút; lặp lại chu kỳ trên 30 lần; 72°C trong 7 phút; giữ ở 20 °C (Demarta *et al.*, 1999; Sen, 2005). Trọng lượng phân tử đoạn DNA của *A. schubertii* cần phát hiện là 322bp.

Qui trình PCR phát hiện *A. schubertii* phân lập từ cá lóc được tối ưu gồm có: (i) Nồng độ Taq DNA polymerase (0,5 U; 1 U; 2 U); (ii) nồng độ dNTPs (0,1 mM; 0,2 mM; 0,3 mM) và (iii) nồng độ MgCl<sub>2</sub> (1 mM; 1,5 mM; 2 mM).

**Xác định độ nhạy của phản ứng PCR phát hiện *A. schubertii*:** Độ nhạy của phản ứng PCR phát hiện *A. schubertii* được thực hiện bằng cách pha loãng 2 lần dung dịch DNA chiết tách từ vi khuẩn chưa pha loãng bằng dung dịch đệm TE (tỷ lệ 1:1) thành nhiều nồng độ từ cao xuống thấp. DNA vi khuẩn giảm dần từ nồng độ chiết tách chưa pha loãng (1900 ng/µl) đến nồng độ sau 6 lần pha loãng (30 ng/ µl).

**Xác định tính chuyên biệt của qui trình PCR phát hiện *A. schubertii*:** Tính chuyên biệt của qui trình PCR phát hiện vi khuẩn *A. schubertii* được thực hiện với các mầm bệnh vi khuẩn phổ biến ở các loài thủy sản nuôi là: *V. parahaemolyticus*, *S. agalactiae*, *F. columnare*, *E. ictaluri*, *A. hydrophila*.

**Điện di:** Sản phẩm PCR 10 µl được điện di trên gel 1,5% agarose (ABgene, UK) có thuốc nhuộm ethidium bromide (0.5 µg/mL) trong dung dịch đệm 0,5X TAE. Kết quả điện di được ghi nhận bằng máy đọc gel (Biorad, USA). Thang DNA 1Kb plus (Invitrogen) được điện di chung với mẫu để xác định kích thước.

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hoá của các chủng *A. schubertii*

Trên môi trường TSA, sau 24-36 giờ ở 28°C, vi khuẩn phát triển tạo thành các khuẩn lạc có hình tròn, lồi, rìa đều, màu kem, có đường kính từ 1 – 1,5 mm. Tất cả các chủng vi khuẩn đều là vi khuẩn gram âm, hình que ngắn, di động, phản ứng dương tính với oxidase và catalase, có khả năng sử dụng đường glucose trong điều kiện hiếu khí và kỵ khí. Kết quả kiểm tra bằng kit API 20E cho thấy các chủng vi khuẩn dương tính với các chỉ tiêu arginine, lysine, phản ứng Voges Proskauer, sử dụng citrate, sinh các loại enzyme β – galactosidase và gelatinase. Tuy nhiên, tất cả các chủng vi khuẩn đều không có khả năng acid hóa một số loại đường, không sinh H<sub>2</sub>S, urea, tryptopane, indole. Dựa trên các chỉ tiêu hình thái,

sinh lý và sinh hóa, tất cả 8 chủng vi khuẩn được định danh thuộc giống *Aeromonas* spp. (Buller, 2004). Kết quả quan sát và phân tích các đặc điểm

hình thái, sinh lý và sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập từ cá lóc bệnh gan thận mù được trình bày ở Bảng 2.

**Bảng 2: Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hoá của các chủng vi khuẩn phân lập từ cá lóc bệnh và chủng chuẩn *Aeromonas schubertii* ATCC 43700 (Buller, 2004)**

Chỉ tiêu	Vi khuẩn phân lập từ cá lóc bệnh (n=8)	<i>Aeromonas schubertii</i> ATCC 43700
Nhuộm Gram	(-)	(-)
Hình dạng	que ngắn	que ngắn
Di động	(+)	(+)
Sinh catalase	(+)	(+)
Sinh oxidase	(+)	(+)
Phản ứng lên men yếm khí	(+)	(+)
Phản ứng lên men hiếu khí	(+)	(+)
ONPG	(+)	(+)
Arginine	(+)	(+)
Lysine	(+)	(+)
Ornithin	(-)	(-)
Sử dụng Citrate	(+)	(+)
Sinh H <sub>2</sub> S	(-)	(-)
Sinh urease	(-)	(-)
Sinh tryptophane	(-)	(-)
Sinh indole	(-)	(-)
Phản ứng Voges - Proskauer	(+)	(-)
Sinh Gelatinase	(+)	(+)
Sử dụng đường		
Glucose	(+)	(+)
Manitol	(-)	(-)
Inositol	(-)	(-)
Sorbitol	(-)	(-)
Rhamnose	(-)	(-)
Sucrose	(-)	(-)
Melibiose	(-)	(-)
Amygdalin	(-)	(-)
Arabinose	(-)	(-)

Ghi chú: (+) dương tính, (-) âm tính

### 3.2 Kết quả giải trình tự

Bốn chủng vi khuẩn (HNL.4.3TT, HNL.6.1T, L.12.8T và L.22.3T) được chọn để khuếch đại gen 16S rRNA và giải trình tự. Kết quả so sánh trình tự nucleotide đoạn gen 16s rRNA trên cơ sở dữ liệu ngân hàng gen (GenBank) bằng chương trình trực

tuyến BLASTn, các chủng HNL.4.3TT (tương đồng 99%), HNL.6.1T (tương đồng 99%), L.12.8T (tương đồng 100%) và L.22.3T (tương đồng 99%) với đoạn 16S rRNA của chủng vi khuẩn chuẩn *Aeromonas schubertii* ATCC 43700 (mã số truy cập GenBank là NR 037014.2) (Hình 1).



*Aeromonas schubertii* chủng ATCC 43700 gen 16S rRNA.  
 Mã số truy cập ngân hàng gen (GenBank Sequence ID) là: NR\_037014.2  
 Tương đồng (Identities): 510/511 (99%)

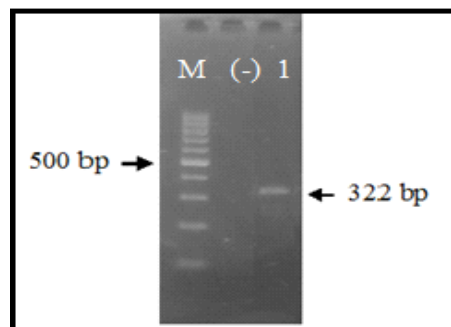
Query	1	TGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGC	60
Sbjct	6	TGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGC	65
Query	61	GGGAGAGTAGCTTGTACTTTTGC CGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGGAT	120
Sbjct	66	GGGAGAGTAGCTTGTACTTTTGC CGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGGAT	125
Query	121	CTGCCAGTCGAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATACGCCCTACGG	180
Sbjct	126	CTGCCAGTCGAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATACGCCCTACGG	185
Query	181	GGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCTTGC GCGATTGGATGAACCCAGGTGGGAT TAGCTTG	240
Sbjct	186	GGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCTTGC GCGATTGGATGAACCCAGGTGGGAT TAGCTTG	245
Query	241	TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGC	300
Sbjct	246	TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGC	305
Query	301	CACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA	360
Sbjct	306	CACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA	365
Query	361	CAATGGGGGAAACCCTGATGCAGC CATGCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA	420
Sbjct	366	CAATGGGGGAAACCCTGATGCAGC CATGCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA	425
Query	421	AGCACTTTTCAGCGAGGAGGAAAGGTTGGTGGTTAATACC TGCCAGCTGTGACGTTACTCG	480
Sbjct	426	AGCACTTTTCAGCGAGGAGGAAAGGTTGGTGGTTAATACC TGCCAGCTGTGACGTTACTCG	485
Query	481	CAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGC	511
Sbjct	486	CAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGC	516

Hình 1: Trình tự gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn HNL.4.3TT phân lập từ cá lóc bệnh đốm trắng ở nội quan so sánh với trình tự gen 16S rRNA của chủng *Aeromonas schubertii* ATCC 43700 (mã số truy cập GenBank là NR 037014.2)

3.3 Kết quả PCR

3.3.1 Quy trình PCR phát hiện vi khuẩn *A. schubertii*

Dựa vào kết quả giải trình tự đoạn gen 16S rDNA đặc trưng của vi khuẩn *A. schubertii*, chủng HNL.4.3TT được chọn để chiết tách DNA và thực hiện qui trình PCR với thành phần hóa chất và điều kiện phản ứng trình bày ở mục 2.4. Kết quả điện di sản phẩm PCR (Hình 2) hiện vạch DNA đặc hiệu của vi khuẩn *A. schubertii* ở vị trí 322 bp. Tuy nhiên, vạch DNA chưa sáng rõ nên cần tối ưu hóa các thành phần hóa chất phản ứng PCR để có kết quả khuếch đại tốt hơn.



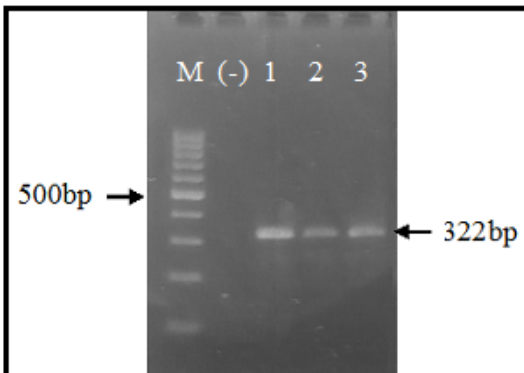
Hình 2: Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *A. schubertii*

Giếng M: thang DNA 100 bp; giếng (-): đối chứng âm (nước); giếng 1: Chủng *A. schubertii* HNL.4.3T.T

3.3.2 Tối ưu một số thành phần phản ứng PCR phát hiện vi khuẩn *A. schubertii*

Tối ưu nồng độ  $MgCl_2$

Nồng độ  $MgCl_2$  ảnh hưởng đến hiệu quả phản ứng PCR do ion  $Mg^{2+}$  ảnh hưởng đến khả năng bắt cặp và gắn môi với mạch khuôn (Khuất Hữu Thanh, 2006). Sử dụng nồng độ  $MgCl_2$  thích hợp sẽ mang lại hiệu quả khuếch đại cao. Do vậy, qui trình được chuẩn hóa với các nồng độ  $MgCl_2$  là: 1 mM, 1,5 mM, 2 mM/phản ứng với thành phần hóa chất và chu kỳ nhiệt không đổi.



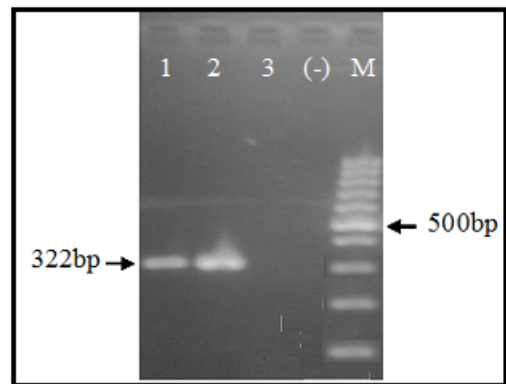
**Hình 3: Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *A. schubertii* sau khi thay đổi nồng độ  $MgCl_2$**

Giếng M: thang DNA 100 bp; Giếng (-): đối chứng âm (nước); Giếng 1: Nồng độ  $MgCl_2$  1 mM; Giếng 2: Nồng độ  $MgCl_2$  1,5 mM; Giếng 3: Nồng độ  $MgCl_2$  2 mM

Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *A. schubertii* sau khi thay đổi nồng độ  $MgCl_2$  ở Hình 3 cho thấy khi giảm nồng độ  $MgCl_2$  (1 mM), vạch DNA đặc hiệu cho *A. schubertii* ở vị trí 322 bp đã hiện rõ hơn, dễ quan sát hơn và không tạo ra sản phẩm không đặc hiệu. Trái lại sau khi tăng nồng độ  $MgCl_2$  lên 2 mM thì phản ứng PCR tạo ra sản phẩm đặc hiệu nhưng hiện vạch mờ hơn, khó quan sát.

Tối ưu nồng độ dNTPs

Nồng độ dNTPs là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả PCR. Khi nồng độ các loại dNTPs quá ít sẽ tạo không đủ sản phẩm PCR để phát hiện. Ngược lại, nồng độ các loại dNTPs quá cao thì phản ứng PCR khó thực hiện. Việc sử dụng nồng độ dNTPs thích hợp sẽ mang lại hiệu quả khuếch đại cho phản ứng PCR (Khuất Hữu Thanh, 2006). Để khảo sát giới hạn phát hiện của qui trình, tiến hành thử nghiệm qui trình PCR phát hiện *A. schubertii* ở các nồng độ dNTPs khác nhau là: 0,1 mM; 0,2 mM và 0,3 mM. Điều kiện chu kỳ nhiệt và các thành phần phản ứng khác không đổi.



**Hình 4: Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *A. schubertii* sau khi thay đổi nồng độ dNTPs**

Giếng M: thang DNA 100 bp; Giếng (-): đối chứng âm (nước); Giếng 1: Nồng độ dNTPs 0,3 mM; Giếng 2: Nồng độ dNTPs 0,2 mM; Giếng 3: Nồng độ dNTPs 0,1 mM

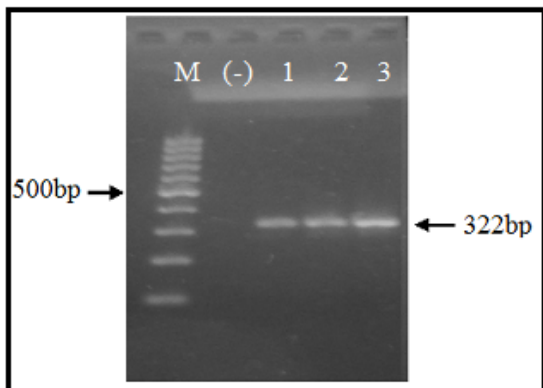
Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *A. schubertii* sau khi thay đổi nồng độ dNTPs ở Hình 4 cho thấy ở nồng độ 0,1 mM thì phản ứng không tạo ra sản phẩm (không hiện vạch) như kết quả ở Hình 2 (hiện vạch nhưng mờ). Điều này cho thấy nồng độ 0,1 mM chưa phù hợp nên kết quả PCR không ổn định. Khi tăng nồng độ dNTPs lên 0,2 mM và 0,3 mM thì phát hiện vạch 322bp đặc hiệu cho *A. schubertii*. Như vậy, chọn nồng độ 0,2 mM dNTPs sẽ phù hợp hơn 0,3 mM dNTPs để tiết kiệm được hóa chất mà vẫn phát hiện vạch đặc hiệu.

Tối ưu nồng độ *Taq* DNA polymerase

Theo Khuất Hữu Thanh (2006), Nồng độ enzym DNA polymerase có ảnh hưởng rất lớn đến hiệu quả PCR. Khi nồng độ enzym DNA polymerase quá ít sẽ không tạo đủ lượng sản phẩm PCR cần thiết. Ngược lại, quá nhiều enzyme DNA polymerase, kết quả PCR tạo nhiều sản phẩm không đặc hiệu. Tiến hành tối ưu Nồng độ *Taq* DNA polymerase của qui trình bằng cách điều chỉnh nồng độ là: 0,5U, 1U và 2U/phản ứng, điều kiện và các thành phần khác không đổi.

Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *A. schubertii* sau khi thay đổi nồng độ *Taq* DNA polymerase ở Hình 5 cho thấy khi tăng hoặc giảm lượng *Taq* DNA polymerase đều tạo ra sản phẩm đặc hiệu cho *A. schubertii* ở vị trí 322 bp, với nồng độ *Taq* DNA polymerase 2U sản phẩm PCR hiện vạch sáng rõ hơn so với nồng độ 0,5U và 1U (nồng độ ban đầu). Trước đó, khi nghiên cứu ở các mức độ *Taq* DNA polymerase khác nhau trong phản ứng mPCR là 0,5U, 1U, 2U, 4U và 8U, Hennegariu *et al.* (1997) đã xác định được nồng độ thích hợp nhất của enzyme này là 2 U/25  $\mu$ L phản ứng. Bởi vì ở các nồng độ cao như 4U và 8U/phản ứng sẽ

tạo ra nhiều vạch sản phẩm không đặc hiệu, trong khi ở nồng độ 0,5 U và 1U thì một số gen mục tiêu lại không được tạo ra. Bên cạnh đó, trong nghiên cứu ứng dụng qui trình PCR chẩn đoán *E.ictaluri*; qui trình mPCR chẩn đoán đồng thời 2 loài vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* (Lê Hữu Thôi và ctv., 2010). Tác giả cũng cho thấy ở nồng độ *Taq* DNA polymerase là 2.5 U sẽ cho kết quả khuếch đại tốt đoạn gen mục tiêu.



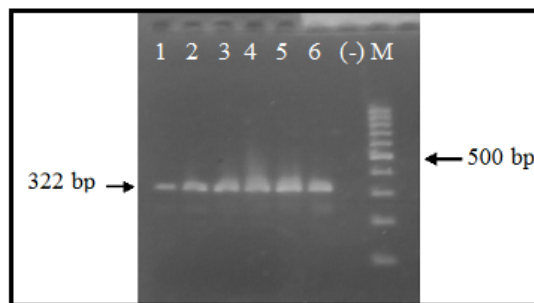
**Hình 5: Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *A. schubertii* sau khi thay đổi nồng độ *Taq* DNA polymerase**

Giếng M: thang DNA 100 bp; Giếng (-): đối chứng âm; Giếng 1: Nồng độ *Taq* DNA polymerase 0,5U; Giếng 2: Nồng độ *Taq* DNA polymerase 1U; Giếng 3: Nồng độ *Taq* DNA polymerase 2U

Tuy nhiên, khi sử dụng nồng độ *Taq* DNA polymerase 1U (nồng độ ban đầu) thì sản phẩm PCR vẫn hiện vạch đặc hiệu 322bp sáng rõ. Nên nồng độ *Taq* DNA polymerase (1U) vẫn được sử dụng cho qui trình PCR phát hiện *A. schubertii*. Như vậy, ở nghiên cứu này, sau khi giảm nồng độ  $MgCl_2$  là 1 mM, giữ nguyên nồng độ *Taq* DNA polymerase (1 U), tăng nồng độ dNTPs (0,2 mM) nhưng giữ nguyên số chu kỳ phản ứng (30 chu kỳ) thì sản phẩm khuếch đại đặc hiệu hiện rõ và không xuất hiện vạch sản phẩm không mong muốn.

### 3.3.3 Độ nhạy của qui trình

Kết quả điện di sản phẩm PCR với 6 hàm lượng DNA vi khuẩn giảm dần từ 1900 đến 30ng/ phản ứng cho thấy tất cả các vạch sản phẩm đều xuất hiện và dễ quan sát. Thành phần hóa chất và chu kỳ nhiệt không đổi với hàm lượng DNA giảm dần (950 ng, 475 ng, 240 ng, 120 ng, 60 ng, 30 ng/phản ứng) cho phản ứng PCR phát hiện vi khuẩn *A.schubertii*.



**Hình 6: Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *A. schubertii* ở các hàm lượng DNA khác nhau**

Giếng M: Thang DNA 100 bp; Giếng (-): đối chứng âm; Giếng 1 – 6: Hàm lượng DNA lần lượt là 30, 60, 120, 240, 475, 950 ng

Kết quả điện di ở Hình 6 cho thấy các vạch sản phẩm sáng mờ dần theo sự giảm dần của hàm lượng DNA từ 950-30 ng nhưng vẫn quan sát được tốt tất cả các vạch. Do đó, quy trình có thể phát hiện được vi khuẩn *A. schubertii* ở hàm lượng DNA thấp hơn 30ng/ phản ứng.

Bên cạnh đó, phương pháp phát hiện số tế bào vi khuẩn trên một đơn vị thể tích hoặc khối lượng mẫu cũng được sử dụng để xác định độ nhạy của qui trình PCR. Theo Trần Nguyễn Diễm Tú (2011), trong nghiên cứu qui trình PCR phát hiện *E. ictaluri*, *A. hydrophila* và *F. columnare* từ máu cá, độ nhạy của qui trình PCR được xác định là mật độ  $4,5 \times 10^4$  CFU/mL máu cá đối với *E. ictaluri*,  $4,5 \times 10^4$  CFU/mL máu cá đối với *A. hydrophila* và  $4,5 \times 10^3$  CFU/mL máu cá đối với *F.columnare*. Hơn nữa, độ nhạy được xác định là  $10^2$  CFU/0,5g mô cá trong nghiên cứu phát triển qui trình PCR phát hiện vi khuẩn *S. agalactiae* trực tiếp từ cá điêu hồng (Trần Thị Tuyết Hoa và ctv., 2014). Lê Hữu Thôi và ctv. (2010) nghiên cứu quy trình mPCR phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *A. hydrophila* từ thận cá tra, xác định độ nhạy của quy trình là 100 pg đối với *A. hydrophila* và 1 ng đối với *E. ictaluri*, cho thấy độ nhạy rất cao. So với kết quả nghiên cứu hiện tại thì quy trình phát hiện *A. schubertii* cho độ nhạy thấp, hàm lượng DNA vẫn còn cao.

### 3.3.4 Tính đặc hiệu của qui trình

Kết quả điện di sản phẩm PCR (Hình 7) cho thấy qui trình khuếch đại chỉ hiện vạch 322 bp của vi khuẩn *A. schubertii* mà không hiện vạch đối với các chủng vi khuẩn thường gây bệnh cho động vật thủy sản được kiểm tra (*S. agalactiae*, *A. hydrophila*, *V. parahaemolyticus*, *E. ictaluri* và *F. columnare*). Như vậy, qui trình PCR được chuẩn hóa có tính đặc hiệu khi phát hiện vi khuẩn *A. schubertii*.





**Hình 7: Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *A. schubertii***

Giếng M: Thang DNA 100 bp; Giếng (-): đối chứng âm; Giếng 1: *A. schubertii*; Giếng 2: *S. agalactiae*; Giếng 3: *F. columnare*; Giếng 4: *V. parahaemolyticus*; Giếng 5: *E. ictaluri*; Giếng 6: *A. hydrophila*

Hassan *et al.* (2003) lần đầu tiên sử dụng cặp mồi STRD-Dyl/dys-16S-23S-2 đã xác định tính đặc hiệu của qui trình PCR giúp phân biệt *Streptococcus dysgalactiae* với nhiều chủng vi khuẩn như *S. canis*, *S. agalactiae* và đặc biệt với loài *Lactococcus garvieae*, khắc phục được sự chẩn đoán nhầm các tác nhân khác nhau nhưng gây ra dấu hiệu bệnh lý giống nhau của các loài vi khuẩn này. Qua đó có thể thấy rằng, nghiên cứu xác định tính đặc hiệu là một trong các yếu tố quan trọng để hoàn thiện một qui trình PCR chẩn đoán tác nhân gây bệnh. Nghiên cứu ứng dụng qui trình mPCR để phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *A. hydrophila*, các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* LMG 4409, *V. anguillarum* LMG 4437, *V. harveyi*, *A. carviae* C-V-TN-A-4-O-1, *Pseudomonas putida* C-V-VL-A-3-S-4, *Escherichia coli* LMG 8223, *Bacillus subtilis* II-A3-9S và *Aeromonas* sp C-V-VL-A-4-O-1 đã được sử dụng để xác định tính đặc hiệu của phản ứng PCR (Lê Hữu Thôi và *ctv.*, 2010). Qua đó có thể thấy rằng nghiên cứu xác định tính đặc hiệu là một trong các yếu tố quan trọng để hoàn thiện một qui trình PCR chẩn đoán tác nhân gây bệnh.

#### 4 KẾT LUẬN

Qui trình PCR được chuẩn hóa có thể chẩn đoán nhanh và đặc hiệu vi khuẩn *A. schubertii* gây bệnh đốm trắng trên nội quan cá lóc với kích thước sản phẩm PCR là 322 bp. Thành phần phản ứng PCR được chuẩn hóa trong 25 µL bao gồm: 1X PCR buffer, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,25 µM mồi Schubertii-16S- (UF-2) F và 0,25 µM Schubertii-16S- (UF-2) R, 1U *Taq* DNA polymerase và 1 µL DNA chiết tách. Độ nhạy của qui trình là 30 ng DNA vi khuẩn /phản ứng; tính đặc hiệu giúp phân biệt mẫu nhiễm vi khuẩn *A.*

*schubertii* với các loài vi khuẩn phổ biến khác trong thủy sản như: *S. agalactiae*, *A. hydrophila*, *V. parahaemolyticus*, *E. ictaluri* và *F. columnare*.

#### LỜI CẢM ƠN

Các nội dung nghiên cứu trong bài báo này được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài “Xây dựng quy trình phòng và trị bệnh cá lóc (*Channa sp*) từ giai đoạn ương giống đến nuôi thịt” mã số 373.2014.2 do Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh An Giang cấp kinh phí.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Barrow, G.I. and R.K.A. Feltham, 1993. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria, 3<sup>rd</sup> edition. Cambridge University Press, Cambridge. 262 pages
- Bartie, K., Đ.T.H. Oanh, G. Huy, C. Dickson, M. Cnockaert, J. Swings, N.T. Phuong and A. Teale, 2006. Tạp chí Công nghệ sinh học 4 (1): 31-40
- Buller, N.B., 2004. Bacteria from fish and other aquatic animals: a practice identification manual, 361 pages.
- Degen, H.J., A. Deufel, D. Eisel, S. Grünwald-Janho and J. Keesey, 2006. PCR Applications Manual. 3<sup>rd</sup> edition Printed in Germany. 338 pages.
- Demarta, A., M. Tonolla, A.P. Caminada, N. Ruggeri and R. Peduzzi, 1999. Signature region within the 16S rDNA se-quences of *Aeromonas popoffii*. FEMS Microbiol. Lett. 172: 239 – 246.
- Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trọng Nghĩa, 2016. Xác định tác nhân gây bệnh gan thận mù trên cá lóc nuôi ở Đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Kỳ 1 tháng 9/2016: 82-89.
- Hassan, A.A., I.U. Khan and C. Lämmler, 2003. Identification of *Streptococcus dysgalactiae* Strains of Lancefield's group C, G and L by Polymerase Chain Reaction. *Zoonoses and Public Health*, 50 (4): 161–165.
- Henegariu, O., N.A. Heerema, S.R. Dlouhy, G.H. Vance and P.H. Vogt, 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and Step-by-Step protocol. *BioTechniques*, 23 (3): 504 – 511.
- Khuất Hữu Thanh, 2006. Kỹ thuật gen nguyên lý và ứng dụng. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật. 270 trang.
- Lê Hữu Thôi, Trương Quỳnh Như, Nguyễn Hà Giang và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2010. Nghiên cứu ứng dụng qui trình mPCR chẩn đoán đồng thời vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*, *Aeromonas hydrophila* trên thận cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ, số 16a: 129 – 135.
- Lê Xuân Sinh và Đỗ Minh Chung, 2010. Hiện trạng và những thách thức cho nghề nuôi cá lóc (*Channa micropeltes*) và (*Channa striata*) ở Đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn –kỳ 2- tháng 08/2010. Trang 56-63.



- Nunan L.M., B.T. Poulos, R. Redman, M. Le Groumellec and D.V. Lightner, 2003 Molecular detection methods developed for a systemic rickettsia-like bacterium (RLB) in *Penaeus monodon* (Decapoda: Crustacea). *Diseases of Aquatic Organisms*, 53 (1):15–23.
- Phạm Minh Đức và Trần Ngọc Tuấn, 2012. Phân lập và xác định khả năng gây bệnh của vi khuẩn *Aeromonas hydrophyla* trên cá lóc (*Channa striata*). *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 1: 69 – 75.
- Phạm Minh Đức, Trần Ngọc Tuấn và Trần Thị Thanh Hiền, 2012. Khảo sát mầm bệnh trên cá lóc (*Channa striata*) nuôi ao thâm canh ở An Giang và Đồng Tháp. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 21b: 124 – 132.
- Sen, K., 2005. Development of a rapid identification method for *Aeromonas* species by multiplex-PCR. *Canadian Journal of Microbiology*, 51 (11): 957-966.
- Trần Nguyễn Diễm Tú, 2011. Nghiên cứu ứng dụng qui trình mPCR phát hiện đồng thời ba loài vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*, *Aeromonas hydrophila* và *Flavobacterium columnare*. Luận văn cao học. Khoa Thủy sản. Trường Đại học Cần Thơ.
- Trần Thị Tuyết Hoa, Dương Thành Long và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2014. Phát triển quy trình PCR phát hiện *Streptococcus agalactiae* trực tiếp từ mô cá điêu hồng. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, số 35: 121-127.
- Tu Thanh Dung, Nguyen Thi Nhu Ngoc, Nguyen Quoc Thinh, Dang Thuy Mai Thy, Nguyen Anh Tuan, Andrew Shinn and Margaret Crumlish, 2008. Common disease of *Pagasius* Catfish Farmed in Viet Nam. *Global Aquaculture Alliance*, July/August: 77 -78.