

PHÁT TRIỂN QUI TRÌNH MPCR PHÁT HIỆN ĐỒNG THỜI VI-RÚT GÂY BỆNH ĐÓM TRẮNG VÀ VI-RÚT GÂY HOẠI TỬ CƠ QUAN TẠO MÁU VÀ CƠ QUAN LẬP BIỂU MÔ Ở TÔM SÚ (*PENAEUS MONODON*) SỬ DỤNG GEN β -ACTIN LÀM NỘI CHUẨN

Trần Việt Tiên¹ và Đặng Thị Hoàng Oanh¹

ABSTRACT

The study was carried out to develop a multiplex RT-PCR protocol for simultaneous detection of WSSV and IHHNV black tiger shrimp *Penaeus monodon* and to control false negative by detecting shrimp endogenous β -actin gene. Based on PCR protocols to detect WSSV from OIE (2006), IHHNV from Yang et al., 2006 and RT-PCR protocol to detect β -actin endogenous gene from Oanh (2008), two mPCR protocol were developed including: (1) protocol for simultaneous detection of WSSV and β -actin which PCR product of 1447 bp (WSSV) and 216 bp (β -actin) (Tran Nguyen Diem Tu, 2008) and (2) protocol for simultaneous detection of IHHNV and β -actin with PCR product of 703 bp (IHHNV) and 216 bp (β -actin) (Duong Thi Kim Loan, 2009). From these results, protocol for simultaneous detection of WSSV, IHHNV and β -actin were developed and optimized. This mPCR protocols has a practical application by using internal control β -actin and reduced cost and save time as two viruses will be detected in a single PCR reaction.

Keywords: *Penaeus monodon*, mPCR, WSSV, IHHNV, β -actin

Title: Development Development of multiplex PCR protocol for simultaneous detection of white spot syndrome virus and infectious hypodermal hematopoietic necrosis virus in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by using β -actin gene as internal control

TÓM TẮT

Đề tài được thực hiện nhằm phát triển và xác định khả năng ứng dụng qui trình mPCR phát hiện đồng thời WSSV, IHHNV trên tôm sú (*Penaeus monodon*) và kiểm soát kết quả âm tính giả bằng cách khuếch đại gen nội sinh β -actin của tôm. Trên cơ sở qui trình PCR phát hiện WSSV theo OIE (2006), qui trình PCR phát hiện IHHNV theo Yang et al. (2006) và qui trình RT-PCR phát hiện gen β -actin ở tôm của Oanh (2008), hai qui trình mPCR được phát triển gồm (1) qui trình phát hiện đồng thời WSSV và gen β -actin cho kết quả đồng thời hai vạch ở vị trí 1447 bp (WSSV) và 216 bp (β -actin) (Trần Nguyễn Diễm Tú, 2008) và (2) qui trình phát hiện đồng thời IHHNV và gen β -actin cho kết quả đồng thời hai vạch ở vị trí 703 bp (IHHNV) và 216 bp (β -actin) (Đương Thị Kim Loan, 2009). Trên cơ sở kết quả đạt được, qui trình mPCR phát hiện đồng thời WSSV, IHHNV và gen β -actin được thực hiện và tối ưu hóa. Kết quả cho thấy qui trình có khả năng ứng dụng tốt với việc sử dụng gen β -actin làm nội chuẩn trong xét nghiệm vi-rút ở tôm bằng phương pháp PCR đồng thời giảm được chi phí xét nghiệm khi phát hiện đồng thời WSSV và IHHNV.

Từ khóa: *Penaeus monodon*, mPCR, WSSV, IHHNV, β -actin

¹ Bộ Môn Sinh học và Bệnh thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần thơ

1 GIỚI THIỆU

Nghề nuôi tôm ở đồng bằng sông Cửu Long đã và đang phát triển rất nhanh, đem lại lợi ích đáng kể về mặt kinh tế và xã hội. Tuy nhiên, khi nghề nuôi được thâm canh hóa thì dịch bệnh cũng xảy ra ngày càng nhiều. Trong đó nghiêm trọng nhất là bệnh do vi-rút gây ra. Những vi-rút gây thiệt hại nặng cho nghề nuôi tôm sú là vi-rút gây bệnh đốm trắng (White spot syndrome virus - WSSV), vi-rút gây hoại tử biểu mô dưới vỏ và cơ quan tạo máu (infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus - IHHNV), vi-rút gây bệnh đầu vàng (yellow head virus - YHV)... Phát hiện sớm mầm bệnh vi-rút để chọn giống là một trong những biện pháp hữu hiệu trong quản lý bệnh tôm. Có nhiều phương pháp được phát triển để phát hiện những loại vi-rút này như mô học, nhuộm nhanh, phản ứng chuỗi trùng hợp (polymerase chain reaction – PCR), lai tại chỗ (*In situ* hybridization),... Trong đó PCR là phương pháp cho phép phát hiện sớm và chính xác tác nhân gây bệnh. Tuy nhiên, một trong những hạn chế đáng kể của PCR là hiện tượng âm tính giả. Trong số các qui trình PCR phát hiện vi-rút trên tôm trong đó có qui trình phát hiện IHHNV được sử dụng không có nội chuẩn để kiểm soát trường hợp âm tính giả. Để ngăn ngừa tổn thất do vi-rút gây ra và đồng thời từng bước khắc phục trường hợp âm tính giả, đề tài: Phát triển qui trình mPCR phát hiện đồng thời White Spot Syndrome Virus (WSSV), Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) và gen β -actin trên tôm sú (*Penaeus monodon*) được thực hiện nhằm phát hiện sớm, chính xác và đồng thời WSSV và IHHNV để giảm chi phí phân tích. Đồng thời, qui trình cũng khuếch đại gen β -actin nhằm làm nội chuẩn để kiểm soát trường hợp âm tính giả do DNA ly trích có chất lượng kém hay do lỗi thao tác.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Hóa chất

dNTP 10 mM (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), dung dịch đệm, $MgCl_2$ 25 mM, Taq DNA polymerase 5UI/ μ l, Ethidium bromide 10 mg/ml, dung dịch điện di TAE 1X, dung dịch nạp mẫu, agarose, nước cất, môi (146 F/R; I 2814, I 3516; β -actin F/R).

2.2 Mẫu vật

Mẫu tôm nhiễm WSSV và IHHNV được xét nghiệm và cho kết quả dương tính bởi Kit IQ 2000 WSSV và IHHNV (thực hiện theo qui trình hướng dẫn của Công ty Farming Intelligene Technology Corperation, Đài Loan).

2.3 Phương pháp

2.3.1 Ly trích DNA

Cho 25 tôm bột vào ống eppendorf 1,5 ml, nghiền với 500 μ l lysis buffer. Ủ mẫu đã chuẩn bị ở 95 °C trong 10 phút, ly tâm (12.000 vòng/phút) trong 10 phút. Sau đó chuyển 200 μ l dung dịch trong ở phần trên sang ống eppendorf 1,5 ml mới có chứa 400 μ l dung dịch 95 % ethanol. Lắc nhẹ và ly tâm (12.000 vòng/phút) trong 5 phút, rút bỏ dung dịch ethanol và làm khô DNA. Hoà tan DNA bằng 200 μ l nước cất hoặc dung dịch TE (0.1 mM EDTA, 0.1 mM Tris-HCl, pH 8.0).

2.3.2 Qui trình PCR

Mẫu DNA chiết tách sau khi được xác định dương tính với WSSV và IHHNV bằng Kit IQ 2000 thì được đo hàm lượng và sử dụng 200 ng để thực hiện phản ứng PCR.

Kết quả nghiên cứu của qui trình này dựa trên cơ sở của 3 qui trình:

Qui trình PCR phát hiện WSSV

Qui trình PCR phát hiện WSSV (OIE, 2006) được thực hiện như sau:

Bước 1: 5 µl dung dịch đệm (10X); 3 µl MgCl₂ (25 mM); 1 µl dNTP (10 mM); 0.4 µl Taq DNA polymerase 5UI/µl; 38.6 µl nước; 0.5 µl mỗi 146 F₁ (100 µM), 0.5 µl mỗi 146 R₁ (100 µM) và 1 µl DNA (WSSV).

Bước 2: 5 µl dung dịch đệm (10X); 3 µl MgCl₂ (25 mM); 1 µl dNTP (10 mM); 0.4 µl Taq DNA polymerase 5UI/µl; 34.6 µl nước; 0.5 µl mỗi 146 F₂ (100 µM), 0.5 µl mỗi 146 R₂ (100 µM) và 5 µl sản phẩm PCR bước 1.

Chu kỳ nhiệt phản ứng là 94°C trong 4 phút; 55°C trong 1 phút; 72°C trong 2 phút; sau đó 94°C trong 1 phút; 55°C trong 1 phút; 72°C trong 2 phút; lặp lại chu kỳ trên 39 lần; 72°C trong 5 phút; giữ 4°C. Đọc kết quả: mẫu dương tính với WSSV sẽ hiện vạch ở vị trí 1447 bp (bước 1) và 941 bp (bước 2) trên gel agarose.

Qui trình PCR phát hiện IHHNV

Qui trình PCR phát hiện IHHNV được thực hiện theo Yang *et al.* (2006) như sau: 2.5 µl dung dịch đệm (10X); 2 µl MgCl₂ (25 mM); 0.5 µl dNTP (10 mM); 0.25 µl Taq DNA polymerase 5UI/µl; 16.75 µl nước; 1 µl mỗi I 2814 (10 µM), 1 µl mỗi I 3516 (10 µM) và 1 µl DNA (IHHNV). Chu kỳ nhiệt phản ứng là 94°C trong 5 phút; sau đó 94°C trong 30 giây; 56°C trong 30 giây; 72°C trong 1 phút; lặp lại chu kỳ trên 30 lần; 72°C trong 5 phút; giữ 4°C. Đọc kết quả: Mẫu hiện vạch ở vị trí 703 bp là mẫu dương tính với IHHNV.

Qui trình RT-PCR phát hiện gen β-actin ở tôm

Thành phần hóa chất khuếch đại qui trình RT-PCR phát hiện gen β-actin (Oanh, 2008) gồm: 2.5 µl dung dịch đệm (10X); 2.5 µl MgCl₂ (25 mM); 0.5 µl dNTP (10 mM); 0.25 µl Taq DNA polymerase 5UI/µl; 15.75 µl nước; 1.25 µl mỗi β-actin F (10 µM), 1.25 µl mỗi β-actin R (10 µM) và 1 µl sản phẩm sao mã ngược/DNA. Chu kỳ nhiệt phản ứng là 94°C trong 1 phút; sau đó 94°C trong 25 giây; 58°C trong 30 giây; 72°C trong 30 giây; lặp lại chu kỳ trên 35 lần; 72°C trong 7 phút, giữ 4°C. Đọc kết quả: Mẫu hiện vạch ở vị trí 216 bp là gen β-actin của tôm trên gel agarose.

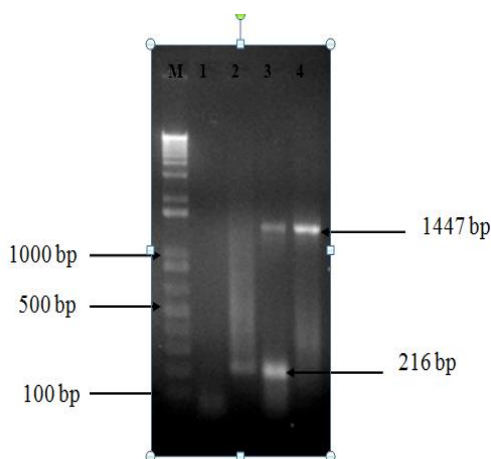
Điện di

10 µl sản phẩm PCR được trộn chung với 2 µl 6X dung dịch nạp mẫu và chạy điện di trên gel agarose 1.5 % (có thuốc nhuộm Ethidium bromide 0.5 µg/ml) trong dung dịch 1 × TAE buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM glacial acetic acid, 0.5 mM EDTA, pH 8.0) ở 100 V trong 30 phút. Kết quả điện di được ghi nhận bằng máy đọc gel Vilber Lourmat (Pháp).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Qui trình mPCR phát hiện WSSV và gen β -actin ở tôm

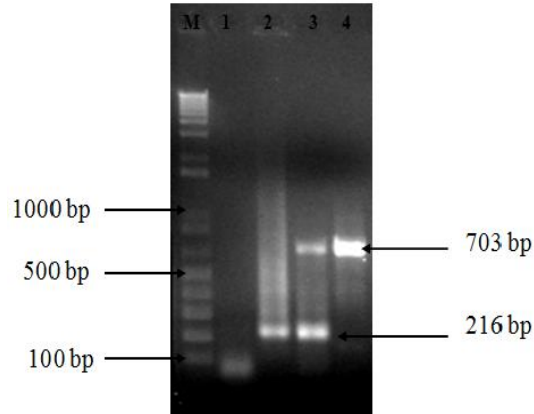
Trên cơ sở qui trình PCR phát hiện WSSV của OIE (2006) và qui trình RT-PCR phát hiện β -actin của Oanh (2008), Qui trình mPCR phát hiện WSSV và gen β -actin được thực hiện như sau: 5 μ l dung dịch đệm (10X); 3 μ l MgCl₂ (25 mM); 1 μ l dNTP (10 mM); 0.4 μ l Taq DNA polymerase 5UI/ μ l; 32.1 μ l nước; 0.5 μ l mỗi 146 F1 (100 μ M), 0.5 μ l mỗi 146 R1 (100 μ M), 1.25 μ l mỗi β -actin F (10 μ M); 1.25 μ l mỗi β -actin R (10 μ M) và 2 μ l DNA (WSSV). Chu kỳ nhiệt phản ứng là 94°C trong 4 phút; 55°C trong 1 phút; 72°C trong 2 phút; sau đó 94°C trong 1 phút; 55°C trong 1 phút; 72°C trong 2 phút; lặp lại chu kỳ trên 39 lần; 72°C trong 5 phút; giữ 4°C. Kết quả điện di cho thấy mẫu hiện đồng thời hai vạch: vạch ở vị trí 1447 bp là mẫu nhiễm WSSV; vạch 216 bp là gen β -actin của tôm (Hình 1).



Hình 1: Kết quả điện di sản phẩm mPCR phát hiện WSSV và β -actin trên tôm. M: thang đo (1Kb plus, Invitrogen); 1: đối chứng âm; 2: mẫu phát hiện β -actin; 3: mẫu phát hiện WSSV và β -actin; 4: mẫu phát hiện WSSV

3.2 Qui trình mPCR phát hiện IHHNV và gen β -actin ở tôm

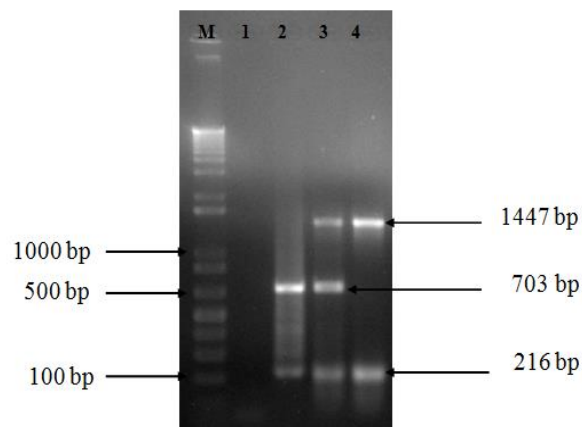
Trên cơ sở qui trình PCR phát hiện IHHNV của Yang *et al.* (2006) và qui trình RT-PCR phát hiện β -actin của Oanh (2008), Qui trình mPCR phát hiện IHHNV và gen β -actin được thực hiện: 2.5 μ l dung dịch đệm (10X); 2 μ l MgCl₂ (25 mM); 0.5 μ l dNTP (10 mM); 0.25 μ l Taq DNA polymerase 5UI/ μ l; 15.5 μ l nước; 1 μ l mỗi I 2814 (10 μ M), 1 μ l mỗi I 3516 (10 μ M), 0.625 μ l mỗi β -actin F (10 μ M); 0.625 μ l mỗi β -actin R (10 μ M) và 1 μ l DNA (IHHNV). Chu kỳ nhiệt phản ứng là 94°C trong 5 phút; sau đó 94°C trong 30 giây; 56°C trong 30 giây; 72°C trong 1 phút; lặp lại chu kỳ trên 30 lần; 72°C trong 5 phút; giữ 4°C. Hình 2 cho thấy (giống 3) mẫu hiện đồng thời hai vạch: vạch 703 bp là mẫu dương tính với IHHNV; vạch 216 bp là gen β -actin của tôm.



Hình 2: Kết quả điện di sản phẩm mPCR phát hiện IHHNV và β -actin trên tôm. M: thang đo (1Kb plus, Invitrogen); 1: đối chứng âm; 2: mẫu phát hiện β -actin; 3: mẫu phát hiện IHHNV và β -actin; 4: mẫu phát hiện IHHNV

3.3 Qui trình mPCR phát hiện WSSV, IHHNV và gen β -actin ở tôm

Trên cơ sở qui trình PCR phát hiện WSSV (OIE, 2006), IHHNV của Yang *et al.* (2006) và qui trình RT-PCR phát hiện β -actin của Oanh (2008), Qui trình mPCR phát hiện WSSV, IHHNV và gen β -actin được thực hiện gồm: 5 μ l dung dịch đệm (10X); 4 μ l $MgCl_2$ (25 mM); 1.5 μ l dNTP (10 mM); 0.5 μ l Taq DNA polymerase 5UI/ μ l; 30 μ l nước; 0.25 μ l mỗi 146 F₁ (100 μ M), 0.25 μ l mỗi 146 R₁ (100 μ M); 2 μ l mỗi I 2814 (10 μ M), 2 μ l mỗi I 3516 (10 μ M), 0.75 μ l mỗi β -actin F (10 μ M); 0.75 μ l mỗi β -actin R (10 μ M) và 1 μ l DNA (WSSV) 2 μ l DNA (IHHNV). Chu kỳ nhiệt phản ứng là 94°C trong 5 phút; sau đó 94°C trong 30 giây; 56°C trong 30 giây; 72°C trong 1 phút; lặp lại chu kỳ trên 30 lần; 72°C trong 5 phút; giữ 4°C. Kết quả chạy điện di (Hình 3) cho thấy ở giếng 3 đã phát hiện được đồng thời cả 3 vạch: WSSV ở vị trí 1447 bp, IHHNV ở vị trí 703 bp và vạch ở vị trí 216 bp là gen β -actin của tôm.



Hình 3: Kết quả điện di sản phẩm mPCR phát hiện WSSV, IHHNV và β -actin trên tôm. M: thang đo (1Kb plus, Invitrogen); 1: đối chứng âm; 2: mẫu phát hiện IHHNV và β -actin; 3: mẫu phát hiện WSSV, IHHNV và β -actin; 4: mẫu phát hiện WSSV và β -actin

Để giải quyết vấn đề lỗi trong khi chạy PCR thì một phản ứng PCR phải có các đối chứng sau: (i) đối chứng âm để kiểm soát trường hợp tạp nhiễm; (ii) đối chứng ADN/ARNtt của vật chủ để chắc chắn acid nucleic của mẫu cũng được khuếch đại và mỗi không đặc hiệu với hệ gen vật chủ và (iii) đối chứng dương chứng tỏ phản ứng PCR có mạch khuôn đặc hiệu với mỗi (Đặng Thị Hoàng Oanh, 2008). Các đối chứng đóng vai trò quan trọng như nhau trong đó nội chuẩn hiện đang được quan tâm khi thực hiện mPCR. β -actin là gen nội sinh, tồn tại khắp nơi và có tính bảo tồn cao, có vai trò quan trọng trong thể hiện những chức năng cơ bản trong cơ thể sinh vật. Actin chia làm 2 dạng: Actin tế bào chất và cơ. Đối với động vật có xương sống và thực vật thì actin tồn tại dưới dạng actin tế bào chất (Vandekerckhove and Weber, 1984). Vì thế nó đã được sử dụng với vai trò là nội chuẩn, ưu thế của nó là giúp kiểm soát được trường hợp âm tính giả mà khi thực hiện các phản ứng PCR thường hay mắc phải đồng thời kiểm tra được chất lượng acid nucleic ly trích. Kết quả các qui trình phát hiện WSSV và β -actin; IHHNV và β -actin; WSSV, IHHNV và β -actin cho thấy qui trình có khả năng ứng dụng tốt cho việc phát hiện chính xác tác nhân gây bệnh trên tôm sú và có thể kiểm soát được trường hợp âm tính giả trong xét nghiệm thông qua nội chuẩn.

4 KẾT LUẬN

Trên cơ sở đạt được trước đó của 2 qui trình: (1) Qui trình mPCR phát hiện đồng thời WSSV và β -actin, sản phẩm PCR cho kết quả đồng thời hai vạch WSSV ở vị trí 1447 bp và 216 bp (β -actin) và (2) Qui trình mPCR phát hiện đồng thời IHHNV và β -actin, sản phẩm PCR cho kết quả đồng thời hai vạch IHHNV (703 bp) và 216 bp (β -actin). Qui trình mPCR được thực hiện và chuẩn hóa phát hiện đồng thời WSSV, IHHNV và β -actin với sản phẩm PCR cho kết quả ba vạch 1447 bp (WSSV), IHHNV (703 bp) và 216 bp (β -actin).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Dang Thi Hoang Oanh, 2008. RNA interference in Penaeid prawns. PhD thesis, School of Molecular and Microbial Sciences, The University of Queensland, Australia.
- Dương Thị Kim Loan, 2009. Phát triển qui trình mPCR (multiplex Polymerase Chain Reaction) phát hiện IHHNV (Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus) và gen nội chuẩn β -actin ở tôm sú (*Penaeus monodon*).
- Manual of diagnostic test for aquatic animal, 2006. White spot disease. www.oie.int/eng/normes/finnual
- Trần Nguyễn Diễm Tú, 2008. Phát triển qui trình mPCR (multiplex Polymerase Chain Reaction) phát hiện WSSV (White Spot Syndrome Virus), HPV (Hepatopancreatic Parvovirus) và gen nội chuẩn β -actin ở tôm sú (*Penaeus monodon*).
- Vandekerckhove, J., K. Weber, 1984. Chordate muscle actins differ distinctly from invertebrate muscle actins. The evolution of the different vertebrate muscle actins. J. Mol. Biol. 179, 391–413.
- Yang, B., X. L. Song, J. Huang, C. Y. Shi, Q. H. Liu and L. Liu. 2006. A single-step multiplex PCR for simultaneous detection of white spot syndrome virus and infectious hypodermal and haematopoietic necrotic virus in penaeid shrimp. Journal of fish Disease. 29: 301-305