

QUI TRÌNH mPCR PHÁT HIỆN ĐỒNG THỜI VI-RÚT GÂY BỆNH ĐỐM TRẮNG, VI-RÚT PARVO GÂY BỆNH GAN TỤY TRÊN TÔM SÚ (*Penaeus monodon*)

Đặng Thị Hoàng Oanh¹, Trần Nguyễn Diễm Tú¹ và Trần Việt Tiên¹

ABSTRACT

*A multiplex PCR protocol for simultaneous detection of WSSV, HPV and β -actin endogenous gene of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) was developed and applied. DNA samples, which were WSSV positive detected by IQ2000 WSSV protocol, were used in OIE (2006) protocol to obtain step 1 PCR products of 1441 bp and step 1 PCR product of 941 bp. mPCR protocols to detect WSSV and β -actin with WSSV of DNA positive samples to obtain PCR products of 1441 bp (WSSV-step1), 941 bp (WSSV-step2) and 261 bp (β -actin) were developed. PCR protocol to detect HPV from Promjai (2002) was used to obtain PCR products of 441 bp. Then, mPCR protocol for simultaneous detection of WSSV, HPV and β -actin was successfully developed. The obtained testing results suggest these protocols can be used for detection of WSSV and HPV with reduced cost and is useful to control false negative result by using β -actin gene as internal control.*

Keywords: PCR, mPCR, WSSV, HPV, *Penaeus monodon*, β -actin

Title: Multiplex PCR protocol for simultaneous detection of white spot syndrome virus (WSSV) and hepatopancreatic parvovirus (HPV) in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

TÓM TẮT

Qui trình mPCR (multiplex polymerase chain reaction) phát hiện đồng thời WSSV, HPV và gen β -actin của tôm sú (*Penaeus monodon*) được phát triển và ứng dụng. Sử dụng mẫu DNA dương tính với WSSV qua xét nghiệm bằng kit IQ2000 WSSV, qui trình PCR phát hiện WSSV (OIE, 2006) được thực hiện cho kết quả mẫu dương tính với WSSV hiện vạch ở vị trí 1441 bp (bước 1) và 941 bp (bước 2). Qui trình mPCR phát hiện đồng thời WSSV và β -actin với mẫu DNA dương tính với WSSV được thực hiện cho kết quả hiện vạch ở vị trí 216 bp (là vạch thể hiện sự có mặt của β -actin), vạch WSSV 1441 bp (bước 1) và vạch 941 bp (bước 2). Qui trình PCR phát hiện HPV (Promjai, 2002) được thực hiện cho kết quả mẫu dương tính hiện vạch ở vị trí 441 bp. Sau đó, qui trình mPCR phát hiện đồng thời WSSV, HPV và β -actin được thực hiện. 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 HPV.

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

1 GIỚI THIỆU

Dịch bệnh đặc biệt là bệnh do vi-rút đã gây thiệt hại nghiêm trọng cho nghề nuôi tôm của nhiều nước trên thế giới trong đó có Việt Nam. Các bệnh vi-rút quan trọng trên tôm sú là vi-rút gây bệnh đốm trắng (white spot syndrome virus – WSSV),

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

Parvovirus gây bệnh trên gan tụy (hepatopancreatic parvovirus – HPV), bệnh đầu vàng (yellow head virus – YHV), bệnh MBV (*Penaeus monodon* – type baculovirus),... Phát hiện sớm mầm bệnh vi-rút để chọn đàn tôm giống không nhiễm vi-rút là một trong những biện pháp hữu hiệu trong quản lý bệnh tôm. Đã có nhiều phương pháp được phát triển để phát hiện và chẩn đoán bệnh vi-rút ở tôm 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 nhanh và chính xác các mầm bệnh vi-rút. Tuy nhiên, một trong những hạn chế của kỹ thuật PCR là hiện tượng âm tính giả do DNA ly trích có chất lượng kém hoặc do lỗi thao tác của người phân tích. Phần lớn các qui trình xét nghiệm vi-rút ở tôm hiện nay không có sử dụng nội chuẩn để kiểm soát các trường hợp âm tính giả nêu trên. Mặt khác chi phí phân tích PCR cao cũng ảnh hưởng đến việc sàng lọc mầm bệnh vi-rút ở tôm giống trước khi thả nuôi. Việc thực hiện và ứng dụng qui trình mPCR phát hiện đồng thời WSSV, HPV và gen β -actin của tôm sú sẽ giúp phát hiện sớm, chính xác và đồng thời WSSV và HPV nhằm giảm được chi phí phân tích. Qui trình cũng khuếch đại gen nội sinh β -actin của tôm 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 Vật liệu nghiên cứu

Mẫu sử dụng phát hiện WSSV là mẫu DNA được ly trích từ tôm bột xét nghiệm tại Khoa Thủy Sản, Trường Đại học Cần Thơ. Mẫu này đã được xác định dương tính với WSSV bằng kit IQ2000 WSSV (Công ty Farming Intelligene Corporation, Đài Loan) và được trữ ở -20°C. Mẫu đối chứng dương sử dụng phát hiện HPV là mẫu DNA đã được phát hiện dương tính với HPV theo qui trình của Promjari (2002).

2.2 Phát hiện WSSV trên tôm bột sử dụng kit IQ2000 WSSV

2.2.1 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).

2.2.2 Nhân bản WSSV DNA

Việc chuẩn bị hỗn hợp cho phản ứng PCR bước 1 và 2 để nhân bản WSSV được thực hiện dựa theo số lượng mẫu cần phân tích. Mỗi lần chuẩn bị mẫu có thêm 3 mẫu đối chứng dương tính (ở các nồng độ 10^3 , 10^2 và 10^1) và một mẫu âm tính (là nước cất hoặc Yeast tRNA do nhà sản xuất cung cấp). Ở bước thứ nhất, hỗn hợp được chuẩn bị trong ống eppendorf 0,2 ml gồm có 7,5 μ l hỗn hợp thứ nhất (First PCR Pre-Mix reagent), 0,5 μ l Iqzyme DNA polymerase (2UI/ μ l) và 2 μ l DNA cần xét nghiệm hoặc mẫu đối chứng vào mỗi phản ứng. Sau đó cho vào mỗi ống 20 μ l

dầu parafin. Chu kỳ nhiệt cho PCR bước 1 là: 94°C trong 30 giây ; 62°C trong 30 giây, 72 °C trong 30 giây, Lặp lại chu kỳ trên 4 lần; 94°C trong 15 giây, 62°C trong 15 giây, 72°C trong 20 giây, Lặp lại chu kỳ trên 14 lần; 72°C trong 30 giây và 20°C trong 30 giây. Sau khi phản ứng kết thúc thêm 15 µl hỗn hợp thứ hai vào ống chứa sản phẩm PCR bước 1. Hỗn hợp thứ 2 được chuẩn bị sẵn gồm 14µl Nested Pre-Mix reagent và 1µl Iqzyme DNA Polymerase (2UI/µl). Chu kỳ nhiệt cho PCR bước 2 là : 94°C trong 20 giây, 62°C trong 20 giây, 72°C trong 30 giây, Lặp lại chu kỳ trên 24 lần; 72°C trong 30 giây; 20°C trong 30 giây.

2.3 Qui trình PCR phát hiện WSSV

Qui trình PCR phát hiện WSSV của OIE được sử dụng như là qui trình cơ bản để thực hiện các qui trình mPCR. Thành phần hóa chất phản ứng PCR bước 1 phát hiện WSSV (OIE, 2006) gồm có: 1X buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 2 U *Taq* DNA polymerase, 1 µM mỗi 146F1, 1 µM mỗi 146R1, 1 µl DNA khuôn, nước. Với chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 94°C trong 4 phút, 55°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút; 94°C trong 4 phút, 55°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút lặp lại chu kỳ trên 39 lần, 72°C trong 5 phút. Tương tự, thành phần hóa chất phản ứng PCR bước 2 phát hiện WSSV (OIE, 2006) gồm: 1X buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 2 U *Taq* DNA polymerase, 1 µM mỗi 146F2, 1 µM mỗi 146R2, 5 µl sản phẩm PCR bước 1, nước. Với chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 94°C trong 4 phút, 55°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút; 94°C trong 4 phút, 55°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút lặp lại chu kỳ trên 39 lần, 72°C trong 5 phút.

2.4 Qui trình mPCR phát hiện WSSV và gen β-actin

Thành phần hóa chất phản ứng mPCR bước 1 phát hiện WSSV và gen β-actin gồm có: 1X buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 2 U *Taq* DNA polymerase, 1 µM mỗi 146F1, 1 µM mỗi 146R1, 0,25 µM mỗi β-actin F, 0,25 µM mỗi β-actin R (Oanh, 2008), 1 µl DNA khuôn, nước. Với chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 94°C trong 4 phút, 55°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút; 94°C trong 4 phút, 55°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút lặp lại chu kỳ trên 39 lần, 72°C trong 5 phút. Thành phần hóa chất phản ứng mPCR bước 2 phát hiện WSSV và gen β-actin gồm: 1X buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 2 U *Taq* DNA polymerase, 1 µM mỗi 146F2, 1 µM mỗi 146R2, 0,25 µM mỗi β-actin F, 0,25 µM mỗi β-actin R, 5 µl sản phẩm PCR bước 1, nước. Với chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 94°C trong 4 phút, 55°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút; 94°C trong 4 phút, 55°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút lặp lại chu kỳ trên 39 lần, 72°C trong 5 phút.

2.5 Thực hiện qui trình mPCR phát hiện WSSV và HPV (theo OIE, 2006)

Thành phần hóa chất phản ứng mPCR bước 1 phát hiện WSSV và HPV gồm có: 1X PCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 2U *Taq* DNA polymerase, 1 µM mỗi 146F1, 1 µM mỗi 146R1, 0,5 µM mỗi HPV441 F/R, 1 µl DNA khuôn (WSSV), 1 µl DNA khuôn (HPV), nước. Với chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 94°C trong 4 phút, 55°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút; 94°C trong 4 phút, 55°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút lặp lại chu kỳ trên 39 lần, 72°C trong 5 phút. Thành phần hóa chất phản ứng mPCR bước 2 phát hiện WSSV và HPV gồm có: 1X PCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 2U *Taq* DNA polymerase, 1 µM mỗi 146F2, 1 µM mỗi 146R2, 0,5 µM mỗi HPV441 F/R, 5 µl sản phẩm PCR

bước 1, nước. Với chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 94°C trong 4 phút, 55°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút; 94°C trong 4 phút, 55°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút lặp lại chu kỳ trên 39 lần, 72°C trong 5 phút.

2.6 Qui trình mPCR phát hiện WSSV, HPV và gen β -actin

Thành phần hóa chất phản ứng mPCR bước 1 phát hiện WSSV, HPV và gen β -actin gồm: 1X Buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 2 U *Taq* DNA polymerase, 1 μ M mỗi 146F1, 1 μ M mỗi 146R1, 0,5 μ M mỗi HPV441 F/R, 0,25 μ M mỗi β -actin F, 0,25 μ M mỗi β -actin R, 1 μ l DNA khuôn (WSSV), 1 μ l DNA khuôn (HPV), nước. Với chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 94°C trong 4 phút, 55°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút; 94°C trong 4 phút, 55°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút lặp lại chu kỳ trên 39 lần, 72°C trong 5 phút. Thành phần hóa chất phản ứng mPCR bước 2 phát hiện WSSV, HPV và gen β -actin gồm có: 1X Buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 2 U *Taq* DNA polymerase, 1 μ M mỗi 146F2, 1 μ M mỗi 146R2, 0,5 μ M mỗi HPV441 F/R, 0,25 μ M mỗi β -actin F, 0,25 μ M mỗi β -actin R, 5 μ l sản phẩm PCR bước 1, nước. Với chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 94°C trong 4 phút, 55°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút; 94°C trong 4 phút, 55°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút lặp lại chu kỳ trên 39 lần, 72°C trong 5 phút.

2.7 Điện di và đọc kết quả

10 μ l sản phẩm PCR được trộn chung với 2 μ l 6X dung dịch nạp mẫu và chạy điện di trên gel agarose 1,5% (có thuốc nhuộm Ethidium bromide 0,5 μ g/ml) trong dung dịch 1 \times 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).

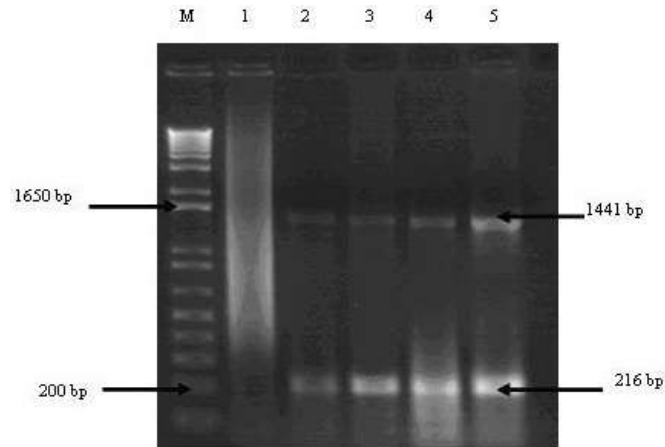
3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thực hiện qui trình mPCR phát hiện WSSV và β -actin

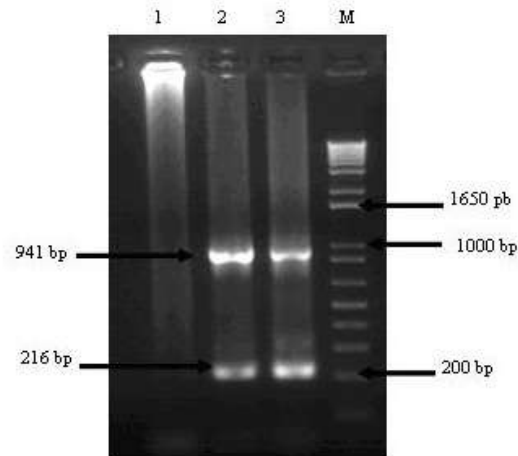
Qui trình mPCR phát hiện đồng thời WSSV và β -actin được thực hiện với mẫu có hàm lượng DNA 200 ng (hàm lượng cho kết quả tốt nhất theo OIE, 2006) và mẫu giữ nguyên hàm lượng DNA sau khi ly trích. Phản ứng mPCR phát hiện WSSV và β -actin được thực hiện với hàm lượng mỗi β -actin là 1,25 μ l và 2,5 μ l. Kết quả hình 1 cho thấy các mẫu kiểm tra đều hiện rõ vạch 1441 bp (WSSV) và 261 bp (gen β -actin). Mẫu giữ nguyên hàm lượng và mẫu có hàm lượng DNA là 200 ng vẫn hiện vạch, có thể là do hàm lượng mẫu giữ nguyên hàm lượng có hàm lượng DNA nằm trong giới hạn phát hiện của qui trình. Mỗi β -actin sử dụng là 1,25 μ l và tăng lên gấp đôi là 2,5 μ l đều cho ra kết quả tốt, cho nên hàm lượng mỗi β -actin là 1,25 μ l được chọn để sử dụng nhằm giảm chi phí phân tích.

Qui trình mPCR (bước 2) phát hiện WSSV và β -actin được thực hiện sử dụng hàm lượng mỗi β -actin là 1,25 μ l. Hình 2 cho thấy giếng 2 và giếng 3 đều hiện rất rõ vạch 941 bp (WSSV) và 216 bp (gen β -actin). Ở giếng 2 thì vạch 941 bp rõ hơn ở giếng 3 do mẫu có hàm lượng DNA là 200 ng. Kết quả thực hiện qui trình mPCR bước 1 và bước 2 cho thấy qui trình có thể sử dụng tốt để phát hiện WSSV tương tự như qui trình của OIE (2006) và tuy nhiên qui trình còn phát hiện thêm gen

β -actin (nội chuẩn) để kiểm soát hiện tượng âm tính giả do DNA ly trích có chất lượng kém hay do lỗi thao tác (ví dụ như quên cho mẫu vào hỗn hợp PCR).



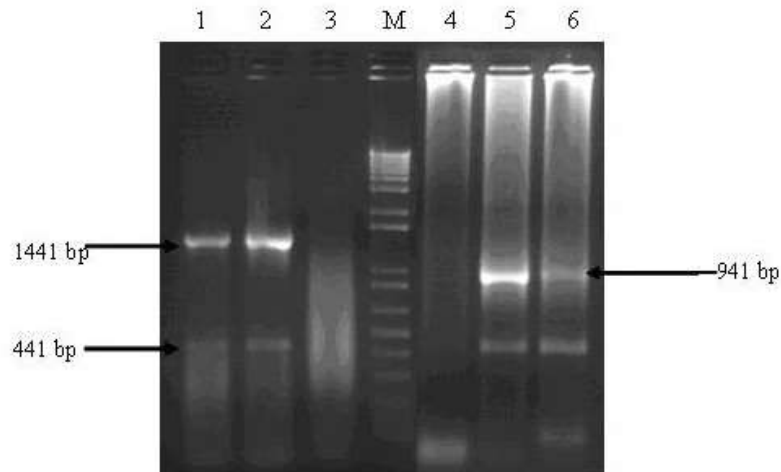
Hình 1: Kết quả điện di sản phẩm mPCR (bước 1) phát hiện WSSV và β -actin. M: thang đo DNA; 1: đối chứng âm; 2: mẫu 1 (200 ng DNA) mỗi β -actin là 1,25 μ l; 3: mẫu 1 (giữ nguyên hàm lượng) mỗi β -actin là 1,25 μ l; 4: mẫu 1 (200 ng DNA) mỗi β -actin là 2,5 μ l; 5: mẫu 1 (giữ nguyên hàm lượng) mỗi β -actin là 2,5 μ l



Hình 2: Kết quả điện di sản phẩm mPCR (bước 2) phát hiện WSSV và β -actin. 1: đối chứng âm; 2: mẫu 1 (200 ng DNA), 1,25 μ l mỗi β -actin; 3: mẫu 1 (giữ nguyên hàm lượng), 1,25 μ l mỗi β -actin; M: thang DNA

3.2 Thực hiện qui trình mPCR phát hiện WSSV và HPV (theo OIE, 2006)

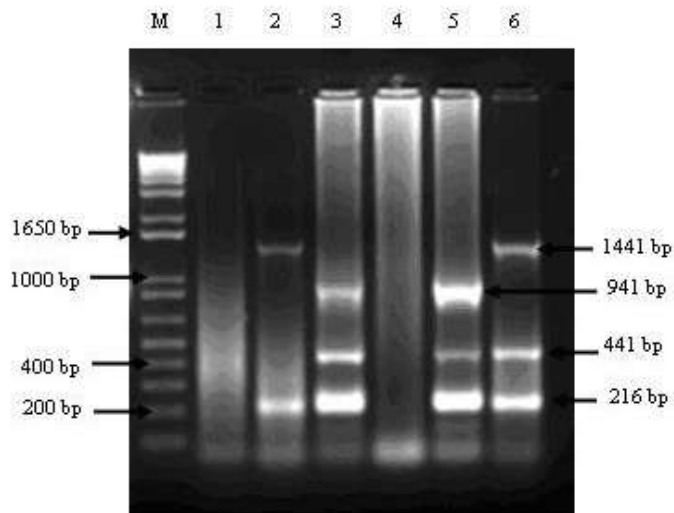
Qui trình mPCR phát hiện đồng thời WSSV, HPV được thực hiện bằng cách sử dụng hai mẫu DNA nhiễm WSSV và HPV. Kết quả điện di ở hình 3 cho thấy ở cả hai bước đều hiện vạch của WSSV tương tự như qui trình phát hiện WSSV của OEI (2006) và qui trình phát hiện HPV của Promjai (2002). Tuy nhiên vạch 1441 bp (bước1) và 941 bp (bước2) thì rõ hơn vạch 441 bp vì đây là qui trình phát hiện WSSV nên mPCR ưu tiên khuếch đại WSSV. Ở giếng 6, vạch 941 bp lại mờ hơn ở giếng 5 là do giếng 5 có hàm lượng DNA là 200 ng nên cho kết quả rõ hơn (OIE, 2006). Kết quả này làm cơ sở cho việc thực hiện tiếp qui trình mPCR phát hiện đồng thời WSSV, HPV và β -actin của tôm.



Hình 3: Kết quả điện di sản phẩm mPCR phát hiện WSSV và HPV (có bổ sung). 1: mẫu 1 (PCR bước 1, 200 ng DNA); 2: mẫu 1 (PCR bước 1, giữ nguyên hàm lượng DNA); 3: đối chứng âm (PCR bước 1); M: thang đo DNA; 4: đối chứng âm (PCR bước 2); 5: mẫu 1 (PCR bước 2, 200 ng DNA); 6: mẫu 1 (PCR bước 2, giữ nguyên hàm lượng DNA)

3.3 Thực hiện qui trình mPCR phát hiện WSSV, HPV và β -actin

Dựa vào kết quả ở mục 3.1 và 3.2 qui trình phát hiện WSSV, HPV và β -actin được thực hiện. Kết quả điện di ở hình 4 cho thấy đối với mẫu giữ nguyên hàm lượng li trích thì ở PCR bước 1 chỉ hiện vạch 1441 bp và 216 bp mà không hiện vạch 441 bp (giếng 2) vì đây là qui trình phát hiện WSSV nên mẫu không hiện vạch ở vị trí HPV do phản ứng ưu tiên khuếch đại WSSV.



Hình 4: Kết quả điện di sản phẩm mPCR phát hiện WSSV, HPV và β -actin. M: thang đo DNA; 1: đối chứng âm (PCR bước 1). 2: mẫu 1 (PCR bước 1, giữ nguyên hàm lượng DNA); 3: mẫu 1 (PCR bước 2, giữ nguyên hàm lượng DNA); 4: đối chứng âm (PCR bước 2); 5: mẫu 1 (PCR bước 2, 200 ng DNA); 6: mẫu 1 (PCR bước 1, 200 ng DNA)

Kết quả mPCR bước 2 thì hiện rõ 3 vạch ở các vị trí 941 bp, 441 bp và 216 bp. Đối với mẫu hàm lượng DNA là 200 ng thì ở cả 2 bước đều hiện cả 3 vạch rõ hơn so với mẫu giữ nguyên hàm lượng (theo OIE, 2006 có bổ sung).

Thông thường phản ứng PCR phải có các đối chứng sau: (i) đối chứng âm để kiểm soát trường hợp tạp nhiễm; (ii) đối chứng ADN/ARN_{tt} của vật chủ để chắc chắn acid nucleic của mẫu cũng được khuếch đại và môi không đặc hiệu với hệ gen vật chủ và (iii) đối chứng dương chứng tỏ phản ứng PCR có mạch khuôn đặc hiệu với môi. Trên cơ sở qui trình PCR phát hiện WSSV của OIE (2006), qui trình PCR phát hiện HPV của Promjai (2002) và qui trình PCR phát hiện gen β -actin của Oanh (2008), qui trình mPCR được thực hiện thành công để phát hiện đồng thời WSSV (1441 bp – bước 1, 941 bp – bước 2), HPV (441 bp) và β -actin (216 bp). Kết quả phát hiện đồng thời WSSV và HPV tương tự với kết quả của OIE (2006) và Promjai (2002), tuy nhiên qui trình còn phát hiện thêm gen β -actin làm nội chuẩn. Từ kết quả đạt được cho thấy qui trình có thể ứng dụng để phát hiện chính xác và đồng thời WSSV, HPV để giảm chi phí phân tích có sử dụng gen β -actin làm nội chuẩn để kiểm soát trường hợp âm tính giả thường gặp trong phân tích.

4 KẾT LUẬN

Qui trình mPCR phát hiện đồng thời WSSV (1441 bp – bước 1, 941 bp – bước 2), HPV (441 bp) và β -actin (216 bp) có khả năng ứng dụng tốt để phát hiện WSSV và HPV trên tôm sú.

LỜI CẢM ƠN

Các nội dung nghiên cứu trong báo cáo này được thực hiện từ nguồn kinh phí nghiên cứu khoa học của Bộ môn Sinh học và Bệnh Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Dang Thi Hoang Oanh, 2008. Inhibition of viral infection by using RNA interference. PhD thesis, School of Molecular and Microbial Sciences, The University of Queensland, Australia.
- OIE, 2006. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic animals 2006. http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/a_00049.htm. Accessed on 16 June 2008.
- Phromjai, J., V. Boonsaeng, B. Withyachumnarnkul, T.W. Flegel, 2002. Detection of Hepatopancreatic in Thai shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization, dot blot hybridization and PCR amplification. *Diseases of Aquatic Organisms* 51:227-232.