

# NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG QUI TRÌNH PCR CHẨN ĐOÁN VI KHUẨN *AEROMONAS HYDROPHILA* TRÊN THẬN CÁ TRA (*PANGASIANODON HYPOPHthalmus*)

Nguyễn Hà Giang<sup>1</sup>, Trương Quỳnh Như<sup>1</sup>, Lê Hữu Thôi<sup>1</sup> và Đặng Thị Hoàng Oanh<sup>1</sup>

## ABSTRACT

*A PCR protocol to detect Aeromonas hydrophila infection in kidney of striped catfish (Pangasianodon hypophthalmus) was optimized. The forward primer AeroFd and reverse primer AeroRs were used to amplify Aerolysin gene of A. hydrophila with a PCR product of 209 bp (Panangala et al., 2007). The lower detection limit was 100 pg extracted DNA from striped catfish kidney. The diagnostic sensitivity and specificity of the PCR was evaluated with common bacterial isolates in aquaculture including Vibrio alginolyticus, V. harveyi, Edwardsiella ictaluri, Escherichia coli, Pseudomonas putida. The PCR appears to be useful for rapid and sensitive detection of A. hydrophila in infected striped catfish with much less time being used when compared to biochemical tests.*

**Keywords:** *Aeromonas hydrophila, Pangasianodon hypophthalmus, PCR, diagnosis*

**Title:** *Study on application of PCR protocol for detection of Aeromonas hydrophila infection in kidney of striped catfish (Pangasianodon hypophthalmus)*

## TÓM TẮT

*Qui trình PCR phát hiện vi khuẩn Aeromonas hydrophila nhiễm trên thận cá tra (Pangasianodon hypophthalmus) được thực hiện và chuẩn hóa. Trong qui trình này môi xuôi AeroFd và môi ngược AeroRs được sử dụng để khuếch đại gen Aerolysin của A. hydrophila với sản phẩm PCR là 209 bp (Panangala et al., 2007). Độ nhạy của qui trình là 100 pg DNA chiết tách từ thận cá tra. Tính đặc hiệu của qui trình được kiểm tra với vi khuẩn phổ biến trong thủy sản là Vibrio alginolyticus, V. harveyi, Edwardsiella ictaluri, Escherichia coli, Pseudomonas putida. Qui trình có thể ứng dụng để phát hiện nhanh và nhạy A. hydrophila nhiễm trên cá tra so với phương pháp sinh hóa truyền thống.*

**Từ khóa:** *Aeromonas hydrophila, Pangasianodon hypophthalmus, PCR, chẩn đoán*

## 1 GIỚI THIỆU

Nghề nuôi thủy sản ở Việt Nam đang phát triển rất nhanh nhất là nghề nuôi cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Do lợi nhuận cao nên diện tích nuôi cá tra tăng rất nhanh với mật độ nuôi cao dẫn đến tình trạng ô nhiễm môi trường, dịch bệnh xảy ra tràn lan và mầm bệnh ngày càng đa dạng. Trong số các bệnh thường gặp ở cá tra thì bệnh xuất huyết do vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* là bệnh gây nhiều thiệt hại cho người nuôi. Tình hình dịch bệnh đòi hỏi phải có một phương pháp chẩn đoán sớm và chính xác mầm bệnh để từ đó có hướng xử lý và điều trị kịp thời. Hiện nay phương pháp phát hiện vi khuẩn *A. hydrophila* trên cá tra phổ biến là sử dụng phương pháp sinh hóa truyền thống hoặc kit API20E (BioMerieux). Tuy nhiên, phương pháp sinh hóa đòi hỏi nhiều thời gian nên chưa đáp ứng được nhu cầu chẩn đoán bệnh trong tình hình hiện nay. Để khắc phục vấn đề này,

---

<sup>1</sup> Bộ Môn Sinh học và Bệnh thủy sản, Khoa Thủy Sản, Trường Đại học Cần Thơ

phương pháp PCR chẩn đoán *A. hydrophila* gây bệnh xuất huyết trên cá tra được thực hiện và ứng dụng dựa trên qui trình PCR phát hiện *A. hydrophila* trên cá nheo mỹ của Panangala *et al.* (2007). Qui trình có giá trị ứng dụng trong việc xác định nhanh và chính xác tác nhân gây bệnh xuất huyết ở cá tra nhằm làm cơ sở cho việc đề xuất giải pháp phòng và trị bệnh hiệu quả.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu nghiên cứu

Các chủng vi khuẩn phân lập từ cá tra bệnh xuất huyết được định danh là *A. hydrophila* bằng kit API 20E được sử dụng để thực hiện các thí nghiệm cảm nhiễm và chuẩn hóa qui trình PCR. Thận cá tra bệnh xuất huyết còn sống lơ lờ từ thí nghiệm cảm nhiễm với vi khuẩn *A. hydrophila* được thu và trữ trong ethanol (Merck) để chiết tách DNA.

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp chiết tách DNA từ vi khuẩn được thực hiện theo Bartie *et al.* (2006). Vi khuẩn được nuôi tăng sinh (16-18 giờ ở 28°C) trong 5 ml môi trường nutrient broth (NB). Chuyển 1.5 ml dung dịch vi khuẩn sang ống eppendorf mới và cho vào 100 µl dung dịch TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0). Hỗn hợp được đun nóng ở 95°C trong 15 phút rồi được làm lạnh nhanh trong nước đá. Ly tâm 2 phút với vận tốc 14000 vòng/phút để tách dung dịch DNA và trữ ở -20°C cho đến khi sử dụng.

Phương pháp phenol chloroform (Taggart *et al.*, 1992) được sử dụng để chiết tách DNA từ thận cá tra. Thận cá (50-100mg) được nghiền nát trong 600µl dung dịch Lysis buffer (0.5M NaCl, 0.001 EDTA, 1% SDS, 0.8% Triton, 0.1M Tris-HCl), 40µl SDS 10% và 2.5µl Proteinase K (40mg/ml). Ủ mẫu 15 phút ở nhiệt độ 37°C. Sau đó cho vào 2.5µl RNase (2mg/ml). Ủ mẫu 30 phút ở nhiệt độ 37°C. Cho vào 600µl Chloroform - Isoamyl (24:1) và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 15 phút ở nhiệt độ 4°C. Cán thận hút dung dịch phía trên chuyển sang 1 ống 1.5ml mới rồi cho vào 600µl Phenol – Chloroform - Isoamyl (25:24:1) và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C. Cán thận hút dung dịch phía trên chuyển sang 1 ống 1.5ml mới. Cho vào 600µl isopropanol lạnh. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C. Loại bỏ dung dịch phía trên. Rửa DNA bằng 600µl cồn 70% lạnh. Loại bỏ cồn phía trên. Lặp lại bước trên 1 lần nữa. Dùng micropipet loại bỏ cồn thật kỹ. Lật ngược và phơi ống trong vài giờ ở nhiệt độ phòng. Hòa tan DNA bằng 50µl TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, có pH=7) và bảo quản ở -20°C. Hàm lượng DNA được xác định bằng máy so màu quang phổ với bước sóng 260nm.

Thành phần phản ứng phát hiện *A. hydrophila* được thực hiện dựa theo qui trình của Panangala và ctv (2007) có điều chỉnh gồm 1X dung dịch đệm 10X; 1.5mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTPs; 2.5U Taq DNA polymerase; 0.4 µM mỗi xuôi (AeroFd); 0.4 µM mỗi ngược (AeroRs) và 20ng mẫu DNA chiết tách từ vi khuẩn *A. hydrophila*. Chu kì nhiệt thực hiện phản ứng là 95°C trong 4 phút; sau đó 95°C

trong 30 giây; 60°C trong 45 giây; 72°C trong 30 giây; lặp lại chu kì trên 30 lần; 72°C trong 10 phút.

Thí nghiệm xác định độ nhạy của phản ứng PCR được thực hiện bằng cách pha loãng từ 10<sup>0</sup> (100ng đối với DNA chiết tách từ vi khuẩn *A. hydrophila*, 1000ng đối với mẫu chiết tách từ thận) đến 10<sup>-5</sup>. Thí nghiệm xác định tính đặc hiệu của qui trình PCR được thực hiện với các loài vi khuẩn phổ biến trong thủy sản là *Vibrio alginolyticus*, *Edwardsiella ictaluri*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* và *Vibrio harveyi*.

Sản phẩm PCR 10µl được chạy điện di trên gel 1% agarose (ABgene, UK) trong dung dịch đệm TAE 0.5X (10 mM Tris, 5 mM acetate, 0.1 mM EDTA). Kết quả điện di được ghi nhận bằng Gel Doc XR System (Bio-Rad). Căn cứ vào thang DNA 1 kb plus (Invitrogen) để xác định trọng lượng phân tử. Sản phẩm khuếch đại đặc hiệu với DNA của vi khuẩn *A. hydrophila* là 209 bp.

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

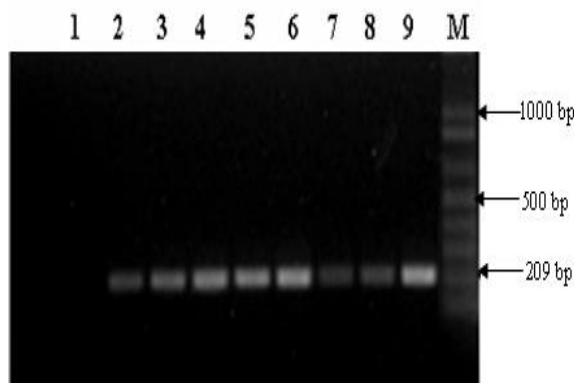
#### 3.1 Qui trình PCR phát hiện *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách từ vi khuẩn

Qui trình PCR phát hiện *A. hydrophila* được thực hiện bằng cách sử dụng 7 mẫu DNA được chiết tách từ 7 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập từ mẫu cá tra bệnh xuất huyết thu ở các tỉnh Vĩnh Long, Đồng Tháp và Cần Thơ (Hình 1).



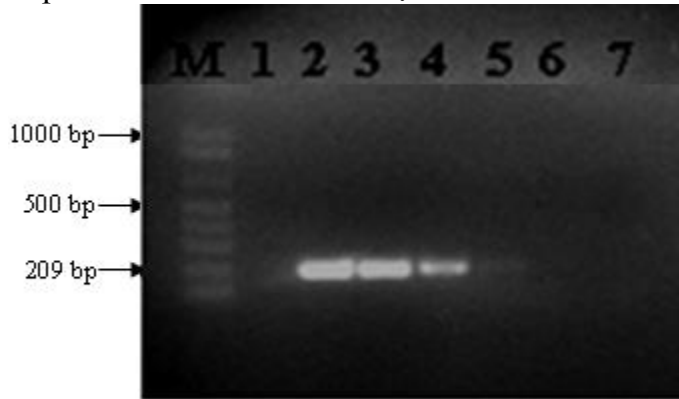
Hình 1: Cá tra có dấu hiệu xuất huyết

Hàm lượng DNA sử dụng cho phản ứng PCR của cả 7 mẫu là 20 ng. Kết quả điện di sản phẩm PCR của tất cả các mẫu đều hiện vạch ở vị trí 209 bp (Hình 2). Mặc dù trong 7 mẫu thì có những vạch hơi mờ nhưng kết quả cho thấy cặp mồi AeroFd và AeroRs khuếch đại đặc hiệu trên gen Aerolysin của vi khuẩn *A. hydrophila* với sản phẩm PCR là 209 bp. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả của Panangala *et al.* (2007).



Hình 2: Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách từ 7 chủng *A. hydrophila* trữ ở -80°C. Giếng M: thang DNA 1 kb plus (Invitrogen); giếng 1: đối chứng âm (nước); giếng 2: đối chứng dương; giếng 3: chủng Ae-CA-T; giếng 4: chủng Ae-SD-T; giếng 5: chủng Ae-CA-TT; giếng 6: chủng Ae-TN-TT; giếng 7: chủng Ae-TN-G; Giếng 8: chủng Ae-TN-T; giếng 9: chủng Ae-SD-TT

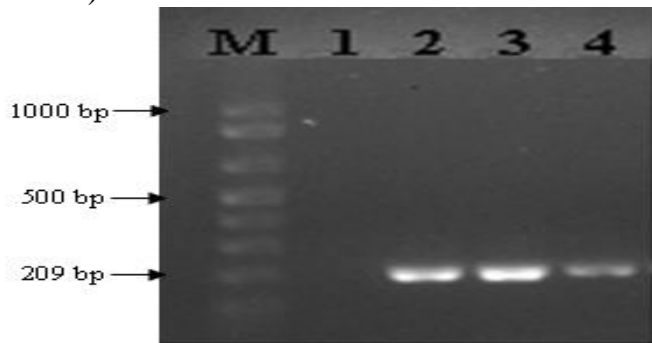
Độ nhạy của qui trình PCR phát hiện *A. hydrophila* được xác định sử dụng DNA chiết tách từ vi khuẩn chủng Ae-SD-TT. Kết quả cho thấy qui trình có thể phát hiện *A. hydrophila* ở hàm lượng DNA khuôn là 100 pg (Hình 3). Từ kết quả cho ta thấy qui trình có độ nhạy rất cao cho phép phát hiện được *A. hydrophila* ở hàm lượng rất thấp, từ đó có thể thực hiện qui trình PCR phát hiện *A. hydrophila* trực tiếp từ DNA chiết tách từ thận cá tra.



**Hình 3:** Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định độ nhạy của qui trình phát hiện *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách từ chủng vi khuẩn Ae-SD-TT. Giếng M: thang DNA 1 kb plus (Invitrogen); giếng 1: đối chứng âm (nước); giếng 2: 100 ng DNA; giếng 3: 10 ng DNA; giếng 4: 1 ng DNA; giếng 5: 100 pg DNA; giếng 6: 10 pg DNA; giếng 7: 1 pg DNA

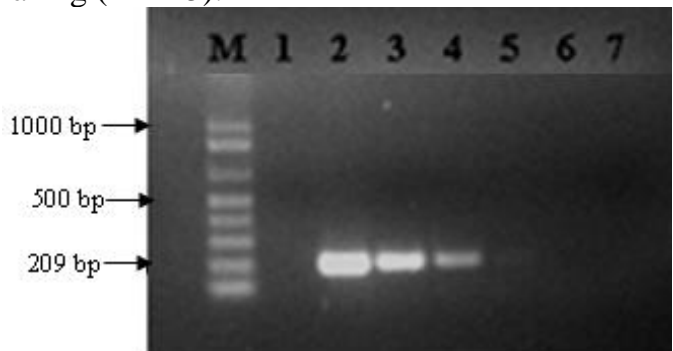
### 3.2 Qui trình PCR phát hiện *A. hydrophila* sử dụng mạch khuôn chiết tách từ vi khuẩn

Qui trình PCR phát hiện *A. hydrophila* được sử dụng để phát hiện mẫu thận cá nhiễm khuẩn bằng cách chọn ngẫu nhiên 2 mẫu DNA chiết tách từ thận cá được tiêm chủng *A. hydrophila* Ae-CA-T. Hàm lượng DNA sử dụng cho phản ứng PCR là 100 ng. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy 2 mẫu đều hiện vạch ở 209bp (Hình 4).



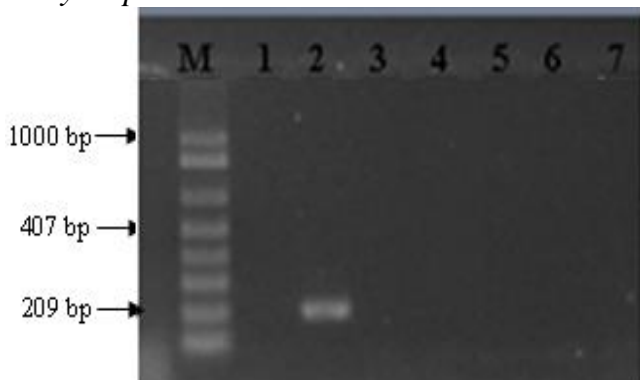
**Hình 4:** Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách từ thận cá bị xuất huyết. Giếng M: thang DNA 1 kb plus (Invitrogen); Giếng 1: đối chứng âm (nước); giếng 2: đối chứng dương; giếng 3: AeC2; giếng 4: AeC3

Kết quả xác định độ nhạy của qui trình PCR sử dụng DNA chiết tách từ thận cá tra (AeC2) cho thấy qui trình có thể phát hiện *A. hydrophila* ở hàm lượng DNA khuôn là 1ng (Hình 5).



**Hình 5:** Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định độ nhạy của qui trình phát hiện *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách thận cá bệnh xuất huyết. Giếng M: thang DNA 1 kb plus (Invitrogen); giếng 1: đối chứng âm (nước); giếng 2: 1000 ng DNA; giếng 3: 100 ng DNA; giếng 4: 10 ng DNA; giếng 5: 1 ng DNA; giếng 6: 100 pg DNA; giếng 7: 10 pg DNA

Tính đặc hiệu của qui trình PCR phát hiện *A. hydrophila* được kiểm tra bằng cách sử dụng DNA chiết tách từ 5 loại vi khuẩn thường gặp trong thủy sản là *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Edwardsiella ictaluri*, *Escherichia coli* và *Pseudomonas putida*. Kết quả điện di sản phẩm PCR (Hình 6) cho thấy chỉ có mẫu *A. hydrophila* (Giếng 2) mới cho sản phẩm PCR hiện vạch ở vị trí 209 bp còn các mẫu còn lại thì không hiện vạch. Điều này chứng tỏ qui trình đặc hiệu để phát hiện *A. hydrophila*.



**Hình 6:** Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định tính đặc hiệu của qui trình phát hiện *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách từ các loài vi khuẩn thường gặp trong thủy sản. Giếng M: thang ADN 1 kb plus (Invitrogen); giếng 1: đối chứng âm (nước); giếng 2: *A. hydrophila*; giếng 3: *Vibrio alginolyticus*; giếng 4: *Edwardsiella ictaluri*; giếng 5: *Escherichia coli*; giếng 6: *Pseudomonas putida*; giếng 7: *Vibrio harveyi*

#### 4 KẾT LUẬN

Qui trình có thể phát hiện được *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách từ vi khuẩn ở hàm lượng DNA khuôn là 100 pg. Ngoài ra, qui trình còn có thể phát hiện *A. hydrophila* ở hàm lượng DNA khuôn là 1ng khi sử dụng DNA chiết tách từ thận cá. Qui trình đặc hiệu với vi khuẩn *A. hydrophila* và có triển vọng ứng dụng tốt để phát hiện *A. hydrophila* trên mẫu cá tra thu ở ao nuôi.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bartie, K., D. T. H. Oanh, G. Huys, C. Dickson, M. Cnockaert, J. Swings, N. T. Phuong and A. Teale, 2006. Ứng dụng REP-PCR và PFGE để định tít vi khuẩn kháng chloramphenicol phân lập tại các trại nuôi thủy sản ở đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí công nghệ sinh học. 4 (1): 31-40.
- Panangala V. S., Craig A. Shoemaker, Vicky L. Van Santen, Kevin Dybvig, Phillip H. Klesius, 2007. Multiplex-PCR for simultaneous detection of 3 bacteria fish pathogen, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila*. Disease of aquatic organisms 74: 199-208.
- Taggart, J. B., R. A. Hynes, P. A. Podohl and A. Ferguson, 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolate from salmonid fishes. Journal of fish Biology 40: 963-965.