

## Nghiên cứu thiết kế mô hình lai phân tử, ứng dụng tạo Kit chẩn đoán nhanh Virut Chikungunya

Vũ Xuân Nghĩa\*; Phạm Đức Minh\*

Nguyễn Trọng Viễn\*; Hoàng Văn Lương\*

### TÓM TẮT

Trong những năm gần đây, dịch sốt xuất huyết (SXH) có diễn biến phức tạp, tỷ lệ tử vong cao. Một trong những nguyên nhân gây SXH là virut *Chikungunya* (CHIKV). Việc chẩn đoán nhanh và sớm mầm bệnh sẽ có ích cho công tác điều trị và dự phòng. Kỹ thuật lai phân tử trong môi trường lỏng đã được nghiên cứu từ lâu và có nhiều ứng dụng trong chẩn đoán. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật lai ADN được ứng dụng trong mô hình chẩn đoán plasmid của CHIKV. Kết quả: kỹ thuật lai cho độ đặc hiệu tuyệt đối, với ngưỡng phát hiện ADN là 0,2 pmol/μl, thời gian của phản ứng lai chỉ cần 1 phút. Do ưu điểm của phương pháp lai trong môi trường lỏng là thời gian tiến hành nhanh, độ chính xác cao, giá thành thấp nên kỹ thuật này có thể được sử dụng trong chẩn đoán vi sinh vật mức độ phân tử.

\* Từ khóa: Virut *Chikungunya*; Lai phân tử; AND; Chẩn đoán phân tử.

## Hybridization model designing and implementation in a rapid test for diagnosis of Chikungunya Virus

### SUMMARY

*Hemorrhagic fever outbreaks are complicated with high mortality in recent years. One of potential pathogens is Chikungunya virus (CHIKV). Early quick test is essential for treatment and epidemic prevention. Liquid hybridization is diversely implemented, especially in diagnostic field. In this study, DNA hybridization technique was used in CHIKV plasmid detection. The results showed that the technique gives a high accuracy, a high sensitivity (0.2 pmol/μl) and a short time consuming (one minute). Therefore, DNA hybridization technique in liquid environment could be used in molecular microbiology diagnostic.*

\* Key words: *Chikungunya virus; Hybridization; DNA; Molecular microbiology diagnostic.*

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Virut *Chikungunya* thuộc họ *Alphavirus*, lây sang người qua vector truyền bệnh là muỗi *Aedes*. CHIKV lần đầu tiên được phân lập năm 1953 tại Tanganyika (nay là Tanzania) [2, 3]. Sau đó, một số vụ dịch xảy ra liên tiếp tại châu Phi [2, 3] và châu Á [4,

5] với số người nhiễm bệnh lên tới hàng trăm, hàng nghìn. SXH do *Chikungunya* đang phát triển như một bệnh dịch mang tính chất địa phương tại nhiều vùng nông thôn của châu Phi nhiệt đới và khu vực ngoại thành của châu Á, với khả năng dịch có thể quay lại sau nhiều năm hoặc thậm chí nhiều thập kỷ vắng bóng [4, 6].

---

\* Học viện Quân y

**Phân biệt khoa học: TS. Trần Văn Khoa**

Bệnh nhân (BN) nhiễm *Chikungunya* thường có triệu chứng sốt đột ngột, kèm theo đau đầu, đau cơ, ban đỏ, điển hình nhất là đau khớp, tạo nên tên của virus. *Chikungunya* có nghĩa là “uốn cong” theo ngôn ngữ của người thổ dân Makonde vùng cao nguyên Tanzania. Một số triệu chứng ít gặp hơn như nôn, xuất huyết. Đa số BN khỏi không để lại di chứng và không có miễn dịch với virus. Tuy nhiên, một số dạng mạn tính có thể thấy: đau khớp kéo dài, đôi khi có rối loạn tâm thần và cảm giác.

Các triệu chứng trên thực sự không khác biệt rõ ở BN SXH do các căn nguyên khác như virus *Dengue*, virus *O'nyong-nyong*, virus *Mayaro*, virus *Ross River*, virus *Barmah Forest*. Chính vì vậy, cần có công cụ chẩn đoán đủ mạnh để có thể chẩn đoán vi sinh vật chính xác đến mức độ loài và chủng gây bệnh. Những thông tin đầy đủ về mầm bệnh của mỗi vụ dịch sẽ giúp ích cho chẩn đoán, điều trị, đặc biệt là dự phòng.

Bên cạnh các phương pháp chẩn đoán cổ điển như nuôi cấy-phân lập, các kỹ thuật miễn dịch học như ELISA, Western-Blot, kỹ thuật lai phân tử đã được nghiên cứu từ lâu và có nhiều ứng dụng trong chẩn đoán. Với ưu điểm đơn giản, vật liệu chủ yếu là chuỗi oligonucleotide, thời gian tiến hành nhanh, độ chính xác cao, kỹ thuật lai phân tử ngày càng được sử dụng rộng rãi trong y học. Nghiên cứu này thiết kế mô hình chẩn đoán CHIKV dựa trên kỹ thuật

lai ADN trong môi trường lỏng, ứng dụng trong test nhanh chẩn đoán mầm bệnh.

## **VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **1. Vật liệu nghiên cứu.**

\* *Mỗi lai ADN:*

Thiết kế oligonucleotide đặc hiệu với CHIKV và virus *Dengue* bằng phần mềm CLC Genomics Workbench 4.0.3 (CLC bio, Đan Mạch) dựa trên cơ sở dữ liệu của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia Hoa Kỳ - NCBI (National Center for Biotechnology Information) và Trung tâm Dữ liệu Mầm bệnh Virus Hoa Kỳ - VIPR (Virus Pathogens Resources).

Trình tự các oligonucleotide lai như sau:

CHIKV\_A:

5'-AGAGGGTTCCGTAACGGTACTCGG-3'

CHIKV\_B:

5'- AAAAATAGCTGTGTACGCGT -3'

DENV\_A:

5'-CGGTGCTACATTGGAAGTCTCGAGTGGG-3'

DENV\_B:

5'- CTCCGCGCTAATTGATAACATA -3'

\* *Chứng dương:*

Các chứng dương, hay khuôn cho phản ứng lai được tổng hợp tại Trung tâm Sinh hóa, Trường Đại học Khoa học Malaysia (CCB@USM). Nghiên cứu này sử dụng 2 khuôn:

Temp\_CHIKV:

5'-CGAGACGCGTGACACAGCTATGTCCC  
TTCAGGCACCGCCGACACAGCTATGTCCCT  
TCAGGCACCGCCGAGTACCGCCACGGA-3'

Temp\_DENV:

5'-TATGGGTACATTTCAACTCGAGTGGG  
ATGGGTGAAGCAGCTGCTTATGCTCACT  
GGAGAAGCAAAAATGCTCCTTGATAACA  
TA -3'

## 2. Phương pháp nghiên cứu.

### \* Quy trình lai ADN:

Phản ứng lai được thiết kế giữa từng oligonucleotide và khuôn, sau đó là oligonucleotide và khuôn với 1  $\mu$ l ADN nồng độ 10 pmol/ $\mu$ l, đệm HB đặt thể tích phản ứng là 50  $\mu$ l. Chu trình nhiệt dựa trên tài liệu của Joan H.M. Knoll và CS (2007) [1]. Nhiệt độ của phản ứng tiến hành ở hai điều kiện khác nhau: 30°C và 50°C. Thời

gian tiến hành phản ứng thay đổi 1; 5; 15 và 30 phút.

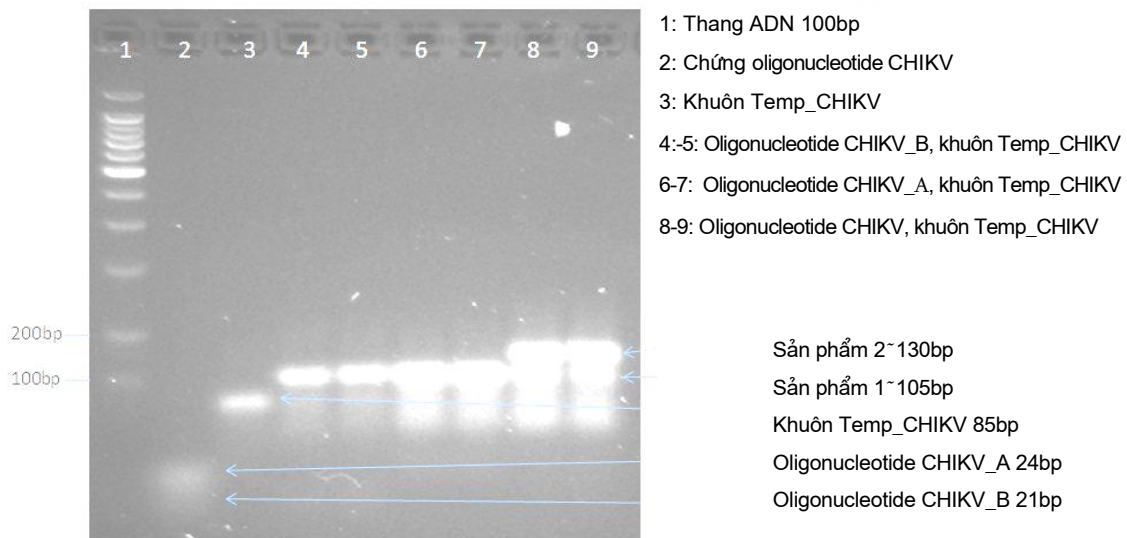
### \* Thiết bị, hóa chất:

- Thiết bị: dụng cụ và thiết bị chuyên dụng của Phòng Vi sinh vật Y học và Mầm bệnh, Trung tâm Nghiên cứu Sinh-Y-Dược học, Học viện Quân y, gồm: máy luân nhiệt tự động GeneAmp PCR system 9700 AB (Applied Biosystems, Hoa Kỳ), máy ly tâm lạnh Mikro 22R (Hettich, Đức), máy soi và chụp gel Dolphin Doc (Waltec, Hoa Kỳ), bộ điện di.

- Hóa chất: hóa chất chính được sử dụng là dung dịch đệm HB (8x SSC; 0,5% SDS), nước khử ion, thạch agarose, SYBR-green để nhuộm gel, thang ADN chuẩn do hãng Sigma cung cấp.

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

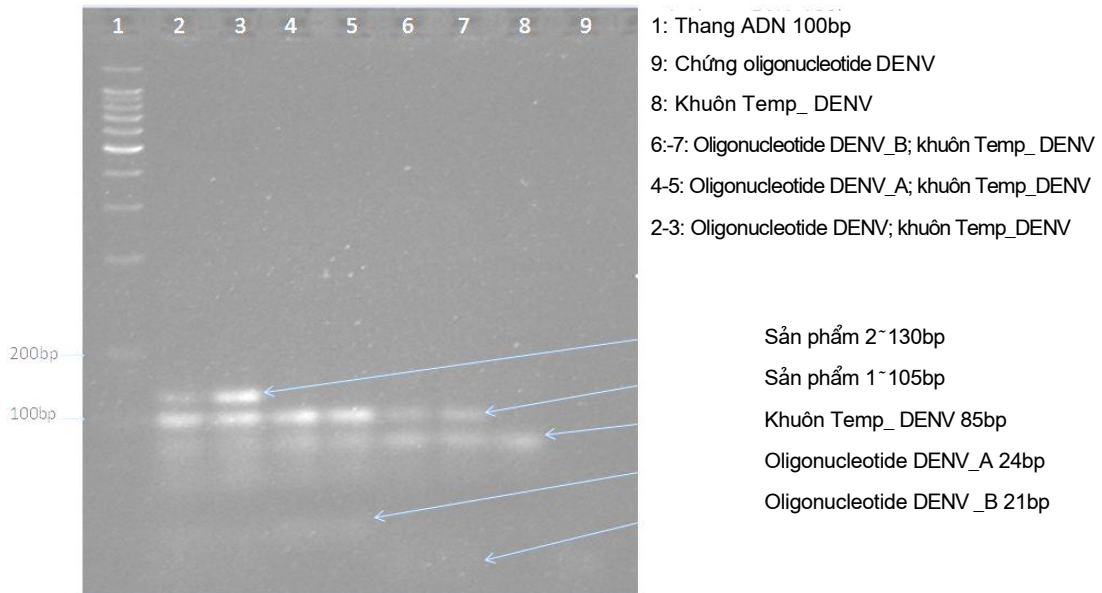
### 1. Phản ứng lai giữa oligonucleotide và oligonucleotide với khuôn virus *Chikungunya*.



Hình 1: Kết quả lai của oligonucleotide phát hiện plasmid khuôn CHIKV.

Oligonucleotide CHIKV bắt cặp với khuôn ADN Temp\_CHIKV. Sản phẩm 1 do gắn giữa khuôn ADN và 01 oligonucleotide, sản phẩm 2 là gắn giữa khuôn ADN và oligonucleotide CHIKV.

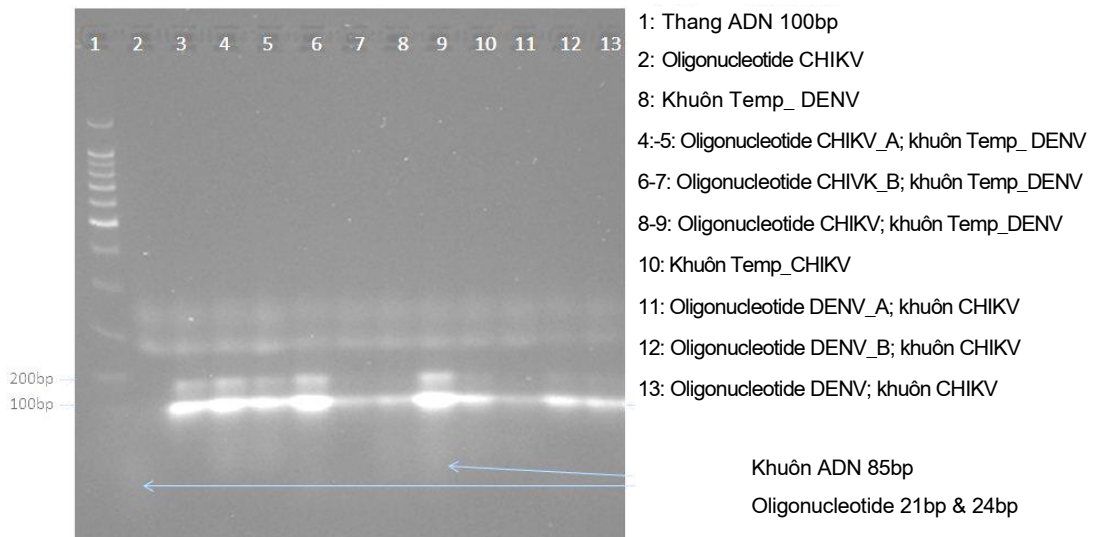
**2. Phản ứng lai từng môi và cặp môi với khuôn virut *Dengue*.**



Hình 2: Kết quả lai của oligonucleotide phát hiện plasmid khuôn DENV.

Oligonucleotide DENV bắt cặp với khuôn ADN Temp\_DENV. Sản phẩm 1: gắn giữa khuôn ADN và oligonucleotide, sản phẩm 2: gắn giữa khuôn ADN và oligonucleotide DENV.

**3. Kiểm tra bắt cặp chéo trong phản ứng lai.**



Hình 3: Kết quả kiểm tra bắt chéo của oligonucleotide.

Oligonucleotide CHIKV không bắt cặp với khuôn ADN DENV. Ngược lại, oligonucleotide DENV không bắt cặp với khuôn ADN của CHIKV.

### BÀN LUẬN

Để phát hiện virus, một số phương pháp thực hiện thường quy ở la bô như: phân lập virus, phát hiện virus bằng kỹ thuật miễn dịch đặc hiệu và phát hiện virus ở mức độ gen bằng kỹ thuật khuếch đại chuỗi axit nucleic [1].

- Phương pháp phân lập virus từ dòng tế bào muỗi C3/36 vẫn được coi là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán virus DEN và CHIK, nhưng cần khoảng 7 ngày và cần có la bô trang bị tốt, bảo đảm vô khuẩn tuyệt đối cùng với kỹ thuật viên trình độ cao. Hơn nữa, việc phân lập virus trên tế bào nuôi cấy từ máu thường không thành công do nuôi cấy CHIKV, DENV rất khó và nồng độ virus trong máu thấp, nhất là ở giai đoạn toàn phát của bệnh.

- Phương pháp huyết thanh học phát hiện IgM và IgG kháng CHIKV, DENV bằng kỹ thuật ELISA [4], tuy nhiên mức độ đặc hiệu của các kỹ thuật miễn dịch phụ thuộc vào mức độ đặc hiệu của kháng thể đơn dòng. Trên thực tế, vẫn có thể có phản ứng chéo giữa các loài và chủng virus khi phát hiện bằng kỹ thuật miễn dịch.

- Phương pháp sinh học phân tử dựa trên phát hiện trình tự genome của virus như: RT-PCR, nested-PCR, RT-PCR. Các phương pháp này có độ nhạy rất cao, nhưng giá thành đắt, cần có nhiều trang thiết bị kèm theo cùng kỹ thuật viên có trình độ cao.

Kỹ thuật lai ADN cho độ nhạy cao. Kết quả cho thấy: phương pháp này có thể phát hiện ADN ở nồng độ 0,2 pmol/ $\mu$ l. Hơn nữa, độ đặc hiệu của phản ứng lai tuyệt đối do oligonucleotide thiết kế để phát hiện khuôn ADN CHIKV không bắt cặp với ADN DENV và ngược lại, oligonucleotide thiết kế cho

khuôn ADN DENV đã không bắt cặp với ADN CHIKV. Phương pháp lai còn dễ thực hiện và cho kết quả nhanh: chỉ cần nhiệt độ hằng định 50°C và thời gian 01 phút, thậm chí ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 15 phút, kết quả của phản ứng lai đã đủ để phát hiện được. Thời gian tính từ xử lý mẫu cho đến đọc kết quả khoảng 1 giờ. Như vậy, kỹ thuật lai ADN trong môi trường lỏng có thể được ứng dụng, tối ưu hóa, làm cơ sở cho việc sản xuất test nhanh chẩn đoán mầm bệnh ở cấp độ phân tử dựa trên trình tự đặc hiệu trên genome. Chẩn đoán sớm, kịp thời sẽ góp phần nâng cao hiệu quả công tác điều trị và dự phòng của các cơ sở y tế.

### KẾT LUẬN

Thiết kế mô hình chẩn đoán CHIKV có thể dựa trên kỹ thuật lai ADN pha lỏng. Kỹ thuật có khả năng phát hiện ADN của virus ở nồng độ 0,2 pmol/ $\mu$ l. Oligonucleotide và khuôn đã thiết kế là đặc hiệu trong phản ứng lai. Kỹ thuật có thể được hoàn thành trong thời gian < 60 phút.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Joan H.M.Knoll et al. In situ hybridization and detection using nonisotopic probes. Current Protocols in Molecular Biology. 14.7.1-14.7.17. 2007, July.
2. McIntosh B.M, Harwin R.M, Paterson H.E, Westwater M.L. An epidemic of Chikungunya in South-Eastern Rhodesia. Cent Afr Med J. 1963, 43, pp.351-359.
3. Roche S, Robin Y. Human infections by Chikungunya virus in Rufisque (Senegal), October-November, 1966. Bull Soc Med Afr Noire. 1967, 12, pp.490-496.
4. Thaikruea L, Chareamsook O, Reanphumkamkit S, Dissomboon P, Phonjan R, Ratchbud S, Kounsang Y, Buranapiyawong D. Chikungunya

in Thailand: a re-emerging disease? Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1997, 28, pp.359-364.

5. *Vu-Quy-Dai, Nguyen-Thi Kim-Thoa, Ly-Quoc-Bang*. Study of anti-Chikungunya antibodies in

Vietnamese children in Saigon. Bull Soc Pathol Exot Filiales. 1967, 60, pp.353-359.

6. *WHO*. *Chikungunya* in South-East Asia - Update. World Health Organisation. 2008.