

QUI TRÌNH RT-PCR PHÁT HIỆN VIRUS GÂY HOẠI TỬ CƠ (Infectious myonecrosis virus-IMNV) TRÊN TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Penaeus vannamei*)

Trần Thị Tuyết Hoa¹ và Trần Thị Mỹ Duyên

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 11/04/2014

Ngày chấp nhận: 30/06/2014

Title:

*A RT-PCR protocol for the detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) in *Penaeus vannamei**

Từ khóa:

*RT-PCR, IMNV, *Penaeus vannamei*, phát hiện*

Keywords:

*RT-PCR, IMNV, *Penaeus vannamei*, detection*

ABSTRACT

Research has optimized the PCR procedure with suitable chemical components, thermal cycling conditions to detect infectious myonecrosis virus in whiteleg shrimp. Research focused to optimise PCR step 2 with the identified PCR master mixture including 1X PCR buffer, 1.0 mM MgCl₂, 200 mM dNTPs, 0.465 μM primers NF and 0.465 μM primers NR, 2.0U Taq polymerase and 1st step PCR product. Thermal cycling conditions included initial denaturation at 95°C for 2 min, followed by 35 cycles of 95°C for 30 seconds, 65°C for 20 seconds, 72°C for 30 seconds and final extension step at 72°C for 7 min. Total amplification time was about 2 hours. This assay was demonstrated to have good sensitivity and specificity for detection of infectious myonecrosis virus in extracted RNA from shrimp.

TÓM TẮT

Nghiên cứu đã xác định được qui trình PCR với thành phần hóa chất, điều kiện chu kỳ nhiệt thích hợp để phát hiện virus gây hoại tử cơ trên tôm thẻ chân trắng. Nghiên cứu tập trung tối ưu hóa bước 2 của qui trình với các thành phần phản ứng được xác định bao gồm đệm PCR 1X; MgCl₂ 1,0 mM; dNTPs 200μM; mỗi NF 0,465μM và mỗi NR 0,465 μM, Taq polymerase 2,0U; mẫu PCR bước 1. Điều kiện nhiệt độ bao gồm giai đoạn biến tính ban đầu ở 95°C trong 2 phút tiếp theo 35 chu kỳ 95°C trong 30 giây, 65°C trong 20 giây, 72°C trong 30 giây, 72°C trong 7 phút. Tổng số thời gian khuếch đại là khoảng 2 giờ. Độ nhạy và độ chuyên biệt của phản ứng phát hiện IMNV cho kết quả tốt với các mẫu ARN chiết tách từ tôm.

1 GIỚI THIỆU

Hiện nay, virus gây hoại tử cơ (Infectious myonecrosis virus-IMNV) là một trong những tác nhân gây trở ngại cho nghề nuôi tôm thẻ chân trắng. Bệnh xuất hiện lần đầu tiên tại miền Đông Bắc Brazil vào năm 2002 (Lightner *et al.*, 2004). Theo tổ chức thú y thế giới, IMNV đã được phát hiện ở nhiều nước châu Á như Indonesia, Thái Lan và Trung Quốc, nguyên nhân là do sự nhập chuyển tôm bố mẹ mang mầm bệnh. Bệnh hoại tử cơ với tỉ lệ chết cao đột ngột, thường xảy ra vào sau các thời

điểm tôm bị gây sốc: hoạt động chài lưới hay sự thay đổi đột ngột của các yếu tố môi trường như độ mặn hay nhiệt độ. Hiện nay, bệnh vẫn chưa có thuốc chữa trị nên việc phòng ngừa và phát hiện bệnh sớm là cần thiết (Senapin *et al.*, 2007; OIE, 2009).

Ở Việt Nam, riêng với tác nhân IMNV vẫn chưa có số liệu cụ thể ghi nhận sự hiện diện của vi-rút này tại các vùng nuôi tôm thẻ chân trắng. Tuy nhiên, có nhiều thông tin trái chiều về sự hiện diện của IMNV ở một số quốc gia nuôi tôm thuộc khu

vực châu Á trong đó có Việt Nam (Senapin *et al.*, 2011). Theo báo cáo này, khu vực châu Á chỉ có Indonesia là quốc gia duy nhất phát hiện có sự tồn tại của IMNV và IMNV gây thiệt hại cho nghề nuôi tôm chân trắng của quốc gia này. Ngoài Indonesia, thông tin về sự tồn tại của IMNV trong mẫu tôm thẻ có hiện tượng đục cơ từ các quốc gia khác thuộc khu vực châu Á đều có thể chỉ là tin đồn và chưa xác thực (Senapin *et al.*, 2011).

Trong nhiều năm qua đã có nhiều phương pháp được ứng dụng để phát hiện IMNV, trong đó phương pháp Polymerase Chain Reaction (PCR) là phương pháp được ứng dụng rộng rãi, cho kết quả nhanh chóng và đáng tin cậy (Lightner *et al.*, 2004). Do vậy, nghiên cứu được thực hiện nhằm ứng dụng qui trình RT-PCR phát hiện Infectious myonecrosis virus-IMNV trên tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) nuôi ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long.

Ứng dụng và phát triển qui trình RT-PCR có độ nhạy và tính chuyên biệt cao giúp phát hiện IMNV ở giai đoạn sớm và phù hợp cho việc phát hiện kiểu gen IMNV phân lập ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Mẫu vật dùng cho nghiên cứu bao gồm các nguồn: (i) Mẫu tôm thẻ chân trắng đã được xác định nhiễm IMNV (được cung cấp từ phòng thí nghiệm của Viện Nuôi trồng thủy sản II); (ii) Các mẫu axit nucleic nhiễm WSSV, IHHNV, TSV, GAV được lựa chọn từ bộ sưu tập của Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ; (iii) Mẫu cDNA của IMNV được cung cấp từ phòng thí nghiệm của Center of Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology (CENTEX SHRIMP), Đại học Mahidol, Thái Lan; (iv) Năm mẫu tôm thẻ chân trắng có dấu hiệu đục cơ thu từ Bạc Liêu (2 mẫu) và Cà Mau (3 mẫu).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Chiết tách ARN

ARN tổng số chiết tách từ mẫu tôm (10-20 mg

mang tôm) với dung dịch Trizol theo qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất (Life Technologies, GIBCO BRL). Hàm lượng ARN chiết tách được xác định bằng phương pháp so màu quang phổ ở bước sóng 260 nm, 280 nm và chất lượng ARN chiết tách được đánh giá qua tỉ lệ 260/280 nm.

2.2.2 Tổng hợp cDNA

cDNA được tổng hợp với môi Rando Hexamers (SuperScript III Reverse Transcriptase, Invitrogen, USA). Trong đó, hỗn hợp A (0,5 µl dNTP (10 mM), 0,5 µl môi Rando Hexamers (50 ng/µl), 5 µl Mẫu RNA (200 ng/µl) và 0,5 µl nước cất) được ủ ở 65 °C trong 5 phút và ủ lạnh trong 5 phút, sau đó trộn với hỗn hợp B (2 µl dung dịch đệm 5X, 0,5 µl DTT, 0,5 µl SuperScript III Reverse transcriptase) đã được ủ ở 42°C trong 5 phút. Giữ ở nhiệt độ phòng khoảng 5 phút. Tiếp theo, trộn hỗn hợp B vào hỗn hợp A và thực hiện các điều kiện phản ứng như sau: 25°C trong 7 phút; 55°C trong 50 phút; 70°C trong 15 phút.

2.2.3 RT-PCR phát hiện IMNV

Nghiên cứu thử nghiệm qui trình RT-PCR sử dụng các đoạn môi 4587 F, 4914 R, 4725 NF, 4863 NR (OIE, 2009) để phát hiện IMNV (Bảng 1). Để phát hiện IMNV, cần thực hiện qui trình khuếch đại cDNA bao gồm 2 bước:

Khuếch đại bước 1 được thực hiện với thành phần hóa chất bao gồm: 1X PCR buffer; 2,5 mM MgCl₂; 200µM dNTPs; 0,62 µM môi NF; 0,62 µM môi NR; 2,5U Taq polymerase; 0,5 µl mẫu cDNA. (ii) Chu kì nhiệt của phản ứng với giai đoạn đầu 95°C trong 2 phút, tiếp theo là lặp lại 39 lần với 95°C trong 30 giây, 65°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây, và giai đoạn kéo dài 72°C trong 2 phút.

Khuếch đại bước 2 được thực hiện với thành phần hóa chất bao gồm: 1X PCR buffer; 1,0 mM MgCl₂; 200µM dNTPs; 0,465 µM môi NF; 0,465 µM môi NR; 2,0U Taq polymerase; (ii) Chu kì nhiệt của phản ứng với giai đoạn đầu 95°C trong 2 phút, tiếp theo là lặp lại 35 lần với 95°C trong 30 giây, 65°C trong 20 giây, 72°C trong 30 giây, và giai đoạn kéo dài 72°C trong 7 phút.

Bảng 1: Trình tự môi sử dụng trong phản ứng RT-PCR

Môi	Trình tự
4587 F	CGA-CGC-TGC-TAA-CCA-TAC-AA
4914 R	ACT-CGG-CTG-TTC-GAT-CAA-GT
4725 NF	GGC-ACA-TGC-TCA-GAG-ACA
4863 NR	AGC-GCT-GAG-TCC-AGT-CTT-G

Sản phẩm PCR được điện di bằng gel agarose 1,5% có chứa 0,5 µg/ml ethidium bromide, trong dung dịch 0,5X TAE (Tris-acetate-EDTA) ở 90V

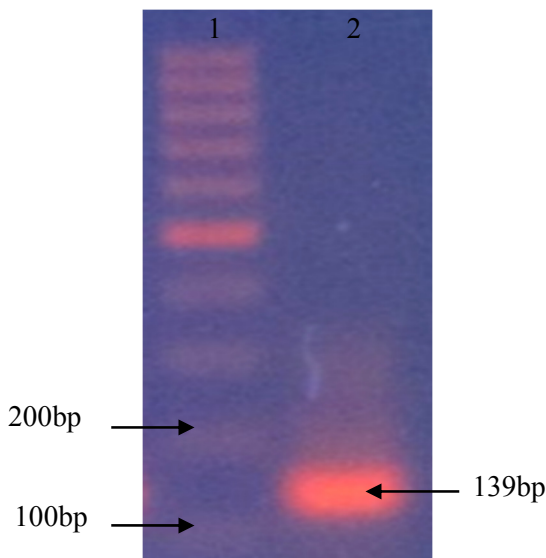
và ghi nhận với thiết bị chụp, xử lí ảnh gel (Geldoc-Biorad).

Căn cứ vào thang ADN 100 bp (Promega) để xác định trọng lượng phân tử của mẫu phân tích. Kết quả được ghi nhận vạch ở vị trí 328 bp là mẫu nhiễm IMNV (sản phẩm PCR bước 1) hay vạch ở vị trí 139 bp là mẫu nhiễm IMNV (sản phẩm PCR bước 2).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Xác định khả năng ứng dụng của các đoạn môi phát hiện IMNV (OIE, 2009)

Mẫu tôm nhiễm IMNV (Viện 2) được chiết tách và thực hiện quy trình RT-PCR phát hiện IMNV (OIE, 2009). Mẫu ARN chiết tách, xác định hàm lượng, tổng hợp cDNA với mỗi Randonde Hexamers và khuếch đại cDNA theo quy trình được mô tả ở mục 2.2. Quy trình được thực hiện và chuẩn hóa ở: (i) thành phần tham gia phản ứng bao gồm các chỉ tiêu: giảm nồng độ Taq (giảm từ 2,5U/phản ứng và cho sản phẩm khuếch đại rõ ở nồng độ 2,0U/phản ứng), giảm nồng độ MgCl₂ (giảm từ 2,5 mM và cho sản phẩm khuếch đại rõ ở nồng độ 1 mM); (ii) điều kiện phản ứng PCR bước 2 bao gồm: giảm số chu kỳ phản ứng từ 39 chu kỳ xuống còn 35 chu kỳ và tăng thời gian tổng hợp của bước kéo dài từ 2 phút lên 7 phút. Sau khi thực hiện các bước chuẩn hóa, quy trình khuếch đại RT-PCR phát hiện IMNV được thực hiện và cho kết quả ghi nhận ở Hình 1.



Hình 1: Kết quả thực hiện quy trình RT-PCR phát hiện IMNV

Giếng 1: Thang 100bp DNA (Promega)
Giếng 2: Sản phẩm PCR bước 2

Kết quả ở Hình 1 cho thấy sản phẩm điện di hiện vạch rõ ở 139bp, là vạch sản phẩm của IMNV

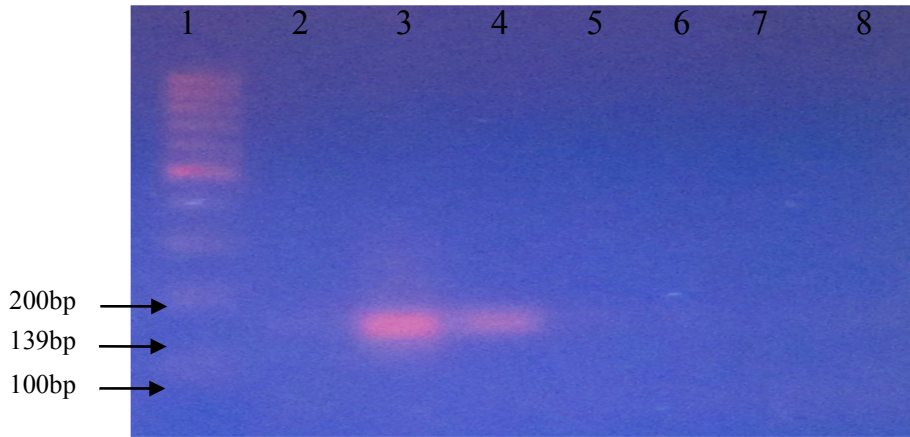
và không có sản phẩm không đặc hiệu. Điều này cho thấy ảnh hưởng của các yếu tố như nồng độ Taq, nồng độ MgCl₂, số chu kỳ phản ứng và thời gian tổng hợp của bước kéo dài đến khả năng khuếch đại của qui trình. Các nguyên nhân này cũng được nhiều tác giả ghi nhận, ví dụ: (i) Hàm lượng Taq cao có thể làm tăng lượng sản phẩm không đặc hiệu (Bartlett and Stirling, 2003); (ii) nồng độ MgCl₂ quá thấp thì phản ứng PCR không thành công vì Taq polymerase không được hoạt hóa thích hợp, nhưng nếu nồng độ MgCl₂ quá cao thì phản ứng mất tính đặc hiệu và quá nhiều sản phẩm được tạo ra (Khuất Hữu Thanh, 2006); (iii) số lượng chu kỳ lặp lại nhiều lần làm tăng lượng sản phẩm không đặc hiệu; (iv) số lượng chu kỳ có quá ít lần lặp lại tạo ra ít sản phẩm (Innis and H. Gelfand, 1990); (v) tăng thời gian tổng hợp cuối để enzyme có thêm thời gian tổng hợp hoàn toàn các sản phẩm (Bartlett and Stirling, 2003). Sự thay đổi điều chỉnh các chỉ tiêu này đã giúp tạo sản phẩm khuếch đại sáng và rõ.

Quy trình được khảo sát thêm một số chỉ tiêu cơ bản về độ nhạy và tính đặc hiệu để tìm hiểu về khả năng ứng dụng của qui trình.

Xác định độ nhạy của quy trình RT-PCR phát hiện IMNV

Để có thể xác định độ nhạy của phản ứng, qui trình được thử nghiệm với một mẫu được pha loãng ở các hàm lượng RNA khác nhau. Một mẫu chiết tách được pha loãng để có các mẫu lần lượt tương ứng với các hàm lượng RNA là 100 ng/μl, 10 ng/μl, 1 ng/μl, 100 pg/μl, 10 pg/μl.

Kết quả hiện vạch sáng ở 139bp điều đó cho thấy có sự có mặt của IMNV trong các mẫu (Hình 2). Mẫu cho vạch sản phẩm khuếch đại ở các nồng độ pha loãng 200 ng/μl, 100 ng/μl và 10 ng/μl trong khi đó ở các nồng độ pha loãng thấp hơn không hiện vạch. So với qui trình RT-PCR phát hiện IMNV của Poulos and Lighner (2006), với khả năng phát hiện khoảng 100 bản sao của virus cho bước 1 và 10 bản sao virus cho bước 2. Kết quả về khả năng phát hiện của qui trình này cho nồng độ phát hiện thấp hơn. Nguyên nhân là do qui trình RT-PCR phát hiện IMNV của Poulos and Lighner (2006) sử dụng mẫu chiết tách ARN từ thể virion tinh sạch (RNA extracted from purified virions). Theo Nguyễn Văn Thanh (2007) nồng độ DNA khuôn ảnh hưởng đáng kể đến quá trình khuếch đại của PCR. Như vậy, quy trình OIE (2009) vừa được ứng dụng trong điều kiện phòng thí nghiệm của Khoa cho phép phát hiện IMNV ở nồng độ 10 ng/μl.



Hình 2: Xác định độ nhạy của quy trình PCR khi pha loãng RNA ở các nồng độ khác nhau

Giếng 1: thang DNA 100bp

Giếng 2: Đối chứng âm (-)

Giếng 3: pha loãng RNA ở nồng độ 200 ng/μl

Giếng 4: pha loãng RNA ở nồng độ 100 ng/μl

Giếng 5: pha loãng RNA ở nồng độ 10 ng/μl

Giếng 6: pha loãng RNA ở nồng độ 1 ng/μl

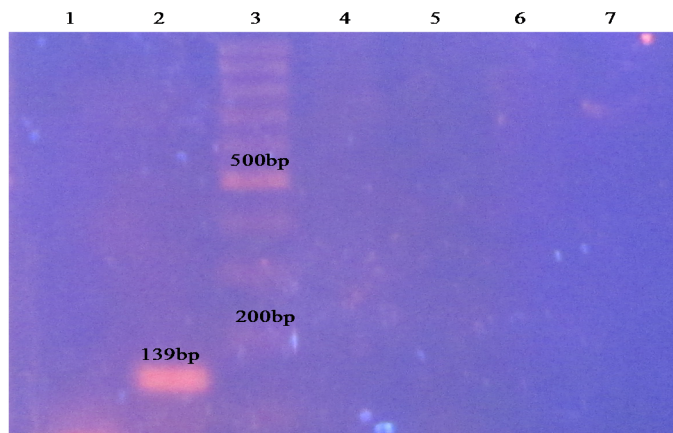
Giếng 7: pha loãng RNA ở nồng độ 100 pg/μl

Giếng 8: pha loãng RNA ở nồng độ 10 pg/μl

Xác định tính chuyên biệt của quy trình RT-PCR

Tính đặc hiệu của qui trình RT-PCR phát hiện IMNV được kiểm tra với các loại virus phổ biến trên tôm. Trong đó, quy trình RT-PCR khuếch đại virus thuộc nhóm ADN mạch đôi (White spot syndrome virus - WSSV), ADN mạch đơn

(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus - IHNV) và virus thuộc nhóm ARN (Gill-associated virus - GAV, Taura syndrome virus - TSV) (Lightner, 1996) để xác định tính chuyên biệt. Kết quả điện di xác định tính đặc hiệu của qui trình PCR phát hiện IMNV thể hiện qua Hình 3.



Hình 3: Kết quả kiểm tra tính chuyên biệt của quy trình RT-PCR với WSSV, IHNV, TSV, GAV

Giếng 1: đối chứng âm (-)

Giếng 2: đối chứng dương (+)

Giếng 3: thang 100 bp DNA (Promega)

Giếng 4: mẫu nhiễm WSSV

Giếng 5: mẫu nhiễm IHNV

Giếng 6: mẫu nhiễm TSV

Giếng 7: mẫu nhiễm GAV

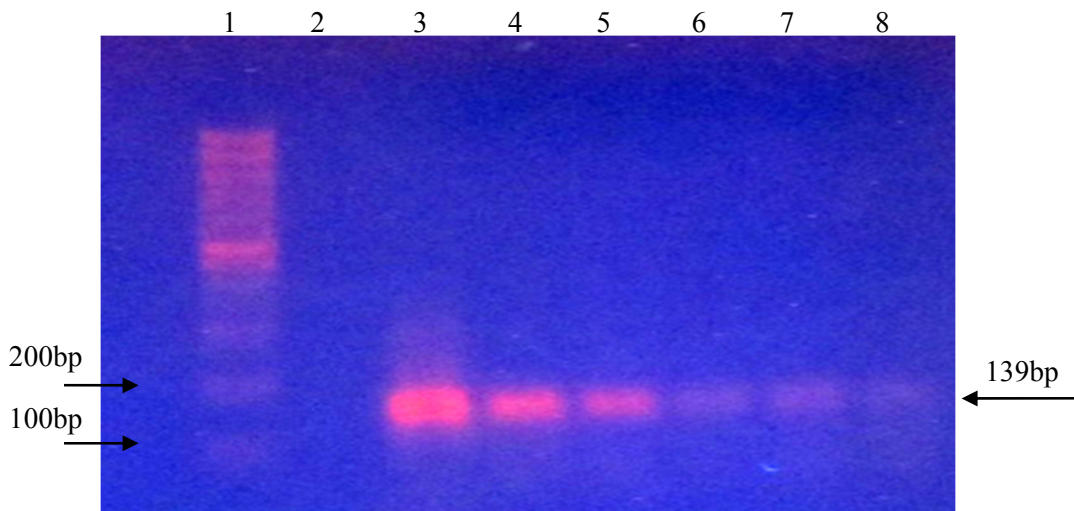
Kết quả Hình 3 cho thấy chỉ có mẫu tôm có nhiễm IMNV (+) hiện vạch sáng ở mức 139bp (Giếng 2) trong khi các mẫu tôm nhiễm WSSV (Giếng 4), IHNV (Giếng 5), TSV (Giếng 6), GAV (Giếng 7) đều cho kết quả âm tính. Qua đó cho thấy cặp mồi sử dụng trong quy trình phát hiện IMNV (OIE, 2009) chuyên biệt với IMNV.

Kết quả khảo sát tính đặc hiệu của qui trình cho thấy qui trình chỉ phát hiện được IMNV mà không phát hiện được các virus khác nhiễm phổ biến trên tôm khi sử dụng các cặp mồi 4587 F, 4914 R; 4725 NF, 4863 NR (OIE, 2009) cho qui trình. Kết quả đạt được cũng tương tự như kết quả khảo sát của Poulos and Lighner (2006) khi sử dụng các cặp mồi này khuếch đại các virus thường gặp trên tôm biển (TSV, IHNV, WSSV). Kết quả ghi nhận là qui trình không tạo ra bất kỳ sản phẩm khuếch đại

từ các mẫu axit nucleic chiết tách từ các virus trên. Như vậy, các cặp mồi sử dụng trong qui trình RT-PCR phát hiện IMNV có tính đặc hiệu chỉ cho phép khuếch đại gen của virus gây hoại tử cơ trên tôm.

3.2 Xác định khả năng ứng dụng của qui trình với một số mẫu tôm thẻ chân trắng với quy trình RT-PCR (OIE, 2009) đã được tối ưu

Để xác định khả năng ứng dụng của quy trình RT-PCR, năm mẫu tôm được thu từ hai tỉnh Cà Mau và Bạc Liêu ở Đồng bằng sông Cửu Long và một mẫu cDNA của IMNV được tổng hợp từ mẫu tôm nhiễm IMNV thu ở Thái Lan được sử dụng để kiểm tra khả năng ứng dụng của quy trình. Các mẫu tôm này được chẩn đoán có dấu hiệu của bệnh lý của bệnh IMN (có hiện tượng tôm chết trong ao, tôm có dấu hiệu đục cơ ở phần bụng).



Hình 4: Khuếch đại PCR từ các mẫu tôm được chiết tách

Giếng 1: Thang DNA 100bp

Giếng 2: Đối chứng âm (-)

Giếng 3: Đối chứng dương (+)

Giếng 4 đến Giếng 5: mẫu tôm *P. vannamei* thu tại Bạc Liêu

Giếng 6 đến Giếng 8: mẫu tôm *P. vannamei* thu tại Cà Mau

Mẫu tôm có dấu hiệu đục cơ được sử dụng chiết tách ARN và khuếch đại với qui trình RT-PCR phát hiện IMNV vừa được tối ưu. Kết quả qui trình RT-PCR cho các sản phẩm khuếch đại ở mức 139bp. Kết quả điện di ở Hình 4 cho thấy: giếng 2 (đối chứng âm) không hiện vạch sản phẩm, giếng 3 (đối chứng dương – mẫu cDNA của IMNV được tổng hợp từ mẫu tôm nhiễm IMNV thu ở Thái Lan) cho kết quả dương tính, giếng 4 –giếng 8 (mẫu tôm thu ở Cà Mau và Bạc Liêu) cho kết quả dương tính.

Các kết quả ghi nhận được cho thấy: (i) Các cặp mồi có tính chuyên biệt khi khuếch đại đúng đoạn DNA của IMNV; (ii) Khả năng phát hiện các mẫu IMNV nhiễm ở tôm. Như vậy, qui trình RT-PCR phát hiện IMNV vừa được tối ưu có thể ứng dụng trong việc chẩn đoán tôm bị nhiễm virus này.

4 KẾT LUẬN

Qui trình RT-PCR được phát triển phù hợp với điều kiện thực tế với các thay đổi về thành phần hoá chất tham gia phản ứng và chu kỳ nhiệt của

phản ứng. Kết quả bước đầu ghi nhận khả năng sử dụng tốt của qui trình RT-PCR trong việc phát hiện IMNV từ mẫu tôm nhiễm IMNV – mẫu đối chứng của Thái Lan, với độ nhạy khoảng 10 ng/μl và thời gian khuếch đại ngắn (2 giờ). Qui trình có thể ứng dụng để xét nghiệm phát hiện IMNV trên tôm giống hoặc tôm bố mẹ.

LỜI CẢM ƠN

Tác giả xin chân thành cảm ơn Giáo sư Tim Flegel, phòng thí nghiệm CENTEX SHRIMP, Đại học Mahidol, Thái Lan; Ths. Nguyễn Việt Dũng, Viện NTTS II đã cung cấp mẫu cho nghiên cứu. Đồng thời, tác giả cũng xin cảm ơn sinh viên Nguyễn Khánh Linh, lớp Nuôi trồng Thủy sản Tiên tiến K35 đã tham gia quá trình phân tích mẫu dùng trong nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bartlett JM, Stirling D (2003). A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol.* 226:3-6.
2. Innis, M A and Gelfand, D H (1990). Optimization of PCRs, in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., Innis, M. A., and White, H., eds.), Academic Press, San Diego, CA, pp. 3–12.
3. Khuất Hữu Thanh (2006). Kỹ thuật gen nguyên lý và ứng dụng. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội. 270 trang.
4. Lightner DV (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society.
5. Lightner DV, Pantoja CR, Poulos BT, Tang KFJ, Redman RM, Pasos de Andrade T, Bonami JR (2004). Infectious myonecrosis: new disease in Pacific white shrimp. *Global Aquacult Advocate* 7:85
6. OIE (Office International des Epizooties) (2009). *Manual of diagnostic tests for aquatic animals*, 4th edn. Office International des Epizooties, Paris
7. Poulos BT and Lightner DV (2006). Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Dis. Aquat. Org.*, 73 69.
8. Poulos BT, Tang KFJ, Bonami JR, Lightner DV (2006) Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *J Gen Virol* 87:987–996
9. Senapin S, Phewsaiya K, Briggs M, Flegel TW (2007) Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture* 266:32-38.
10. Senapin S, Phiwsalya, K, Gangnonngiw W and Flegel T.W. (2011). False rumours of disease outbreaks caused by infectious myonecrosis virus (IMNV) in the whiteleg shrimp in Asia. *J. Negat. Results Biomed*, 10.