

KHẢO SÁT TÍNH ĐẶC HIỆU CỦA MỘT SỐ CẶP MÔI ỨNG DỤNG TRONG BỘ KIT PHÁT HIỆN NHANH VI KHUẨN VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS TRÊN TÔM SÚ BẰNG PHƯƠNG PHÁP PCR

Đoàn Thị Minh Nguyệt⁽¹⁾, Trần Thị Tuyết Nga⁽²⁾,
Huỳnh Thị Hồng Phượng⁽²⁾, Nguyễn Hữu Thanh⁽¹⁾

(1) Trường Đại học An Giang; (2) Công ty TNHH MTV Sinh hóa PHUSA

Ngày nhận bài 06/04/2019; Ngày gửi phản biện 08/04/2019; Chấp nhận đăng 15/05/2019

Email: dtmnguyet@agu.edu.vn

Tóm tắt

Sản xuất tôm sú có thể mang lại giá trị kinh tế cao. Tuy nhiên, tôm sú thường hay bị bệnh, nhất là bệnh gan do vi khuẩn. Vì vậy, nhằm có thể giúp phát hiện nhanh bệnh, nghiên cứu này đã được thực hiện. Nghiên cứu này đã khảo sát cặp môi đặc hiệu phát hiện nhanh và chính xác vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* (VP) gây bệnh hủy hoại gan tủy (AHPND) trên tôm sú bằng phương pháp PCR đã được thực hiện trên ba cặp môi tên là V1, V2, V3. Cả 3 cặp môi đều có khả năng làm môi khuếch đại cho đoạn gene *toxR* trên vi khuẩn VP. Kết quả cho thấy V1 là cặp môi đặc hiệu nhất có trình tự môi xuôi 5'-GTCTTCTGACGCAATCGTTG-3'; môi ngược 5'-ATACGAGTGGTTGCTGTCATG-3' đáp ứng khả năng phát hiện vi khuẩn VP trên tôm sú với một số đặc điểm: i) nhiệt độ gắn môi thích hợp là 58 °C ii) độ nhạy của môi là 186,5 x10⁻⁴ ng/μL và iii) môi không bắt cặp với trình tự DNA của hai loại virus gây bệnh còi *Monodon Baculovirus* (MBV) và bệnh đốm trắng *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) có biểu hiện bệnh gần giống như bệnh gây ra bởi vi khuẩn VP. Ứng dụng cặp môi V1 đã phát hiện bốn mẫu tôm bị nhiễm VP trong tám mẫu thu tại chợ.

Từ khóa: Vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*, cặp môi đặc hiệu

Abstract

SURVEY ON THE SPECIFIC OF SOME PAIRS APPLYING IN THE KIT FOR QUICK AND ACCURATE DETECTION OF VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS BACTERIA ON TIGER SHRIMP BY PCR METHOD

Shrimp production can bring highly economic values. However, shrimp often get infected by bacteria, particularly live disease. Thus, to help detect the disease rapidly, this study was conducted. The study investigated specific primers for rapid and accurate detection of *Vibrio parahaemolyticus* (VP) causing of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in tiger shrimp by PCR, which were performed on three primer pairs called V1, V2, and V3. All three primer pairs have the ability to amplify the *toxR* gene segment on VP bacteria. The results showed that V1 is the most specific primer pair with the forward primer sequence 5'-GTCTTCTGACGCAATCGTTG-3' and the reverse 5'-ATACGAGTGGTTGCTGTCATG-3' rmeets VP bacterium detection capacity on black tiger shrimp with a number of characteristics: i) the appropriate priming temperature is 58 °C ii) the sensitivity of primer is 186.5 x 10⁻⁴ ng/μL and iii) non-paired primers with DNA sequences of two whistle-causing viruses *Monodon Baculovirus*

(MBV) and White Spot Syndrome Virus (WSSV) exhibit disease-like illness caused by micro VP bacteria. Application of V1 primer pair detected four samples of VP contaminated shrimp in eight samples collected at the market.

1. Giới thiệu

Tình hình dịch bệnh ảnh hưởng không nhỏ đến nghề tôm nuôi trong đó hội chứng hoại tử gan tụy cấp tính (Acute hepatopancreatic necrosis syndrome - AHPNS) hay còn gọi là hội chứng chết sớm (Early mortality syndrome – EMS) khiến cho tôm nuôi chết trong vòng 24 - 48 giờ (Sirikharin và cs., 2015), tỷ lệ chết có thể lên đến 100% gây thiệt hại to lớn cho người nuôi tôm chủ yếu do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* (VP) gây ra đã thiệt hại rất nhiều cho nghề nuôi tôm. Vi khuẩn VP là vi khuẩn gram (-), không sinh bào tử, có dạng hình que, trụ, cong hoặc thẳng, kích thước 0,5 - 0,8 µm x 1,4 - 2,4 µm, là vi khuẩn ưa mặn, sinh trưởng ở nồng độ NaCl từ 1,5 - 6%. (Mirbakhsh và cs., 2014). Nồng độ NaCl 3% là tối ưu cho VP phát triển, VP có thể sinh trưởng ở nhiệt độ từ 10 – 43 °C, tối ưu là 37 °C. Ở điều kiện thuận lợi, thời gian thế hệ của vi khuẩn là 8 - 9 phút với mật độ là 10⁶ tế bào. Daniels và cs. (2000), pH tối ưu là từ 7,8 - 8,6, sự sinh trưởng bị ức chế khi có sự hiện diện của 0,1% acetic acid (pH = 5,1). Trong môi trường lỏng Tryptic Soy Broth (TSB) 2% NaCl, vi khuẩn mọc nhanh, tạo nhiều sinh khối. Trên môi trường thạch rắn TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts sucrose), khuẩn lạc VP có màu xanh, bóng, nhô cao, đường kính khoảng 3-4 mm, tâm có màu đậm hơn, không làm axit hóa môi trường bên dưới khuẩn lạc, đây là đặc điểm để phân biệt với khuẩn lạc của *Vibrio cholerae* (Trần, 2006). Mặc dù có nhiều nghiên cứu về chẩn đoán bệnh thông qua dấu hiệu lâm sàng như vỏ mềm và tối, bơi chậm chạp, bỏ ăn, sự đổi màu của gan tụy là dấu hiệu chính cho thấy sự nhiễm bệnh trên tôm (Zorriehzahra & Banaederakhshan, 2015), việc phát hiện vi khuẩn VP bằng phương pháp nuôi cấy truyền thống tốn rất nhiều thời gian, công sức lao động, tăng chi phí sản xuất... việc tìm ra một phương pháp mới, phát hiện nhanh và chính xác vi khuẩn này là một nhu cầu cần thiết. Trong những năm gần đây, dựa trên những thành tựu nổi bật của sinh học phân tử, nhiều phương pháp mới đã được đề nghị trong đó phương pháp PCR (Polymerase chain reaction) được xem là phương pháp phát hiện nhanh và chính xác vi khuẩn VP (Mirbakhsh và cs., 2014; Lightner và cs., 2013). Phương pháp này còn giúp khắc phục các nhược điểm không thể bảo quản, vận chuyển các thành phần phản ứng đi xa, giúp rút ngắn thời gian trong phát hiện, hạn chế nguy cơ ngoại nhiễm, dễ bảo quản, dễ vận chuyển, thao tác đơn giản, nhanh, tiện lợi... Một trong những yếu tố quan trọng trong phát hiện nhanh vi khuẩn VP bằng phương pháp PCR là phải chọn được cặp mồi đặc hiệu tức cặp mồi này phải đạt được một yêu cầu cơ bản như tỉ lệ GC, chiều dài của mồi đồng thời phải đáp ứng nghiêm ngặt một số yếu tố của cặp mồi về nhiệt độ bắt cặp, độ đặc hiệu và độ nhạy để chẩn đoán bệnh chính xác tránh nhầm lẫn với một số bệnh như bệnh còi và bệnh đốm trắng trên tôm có biểu hiện bệnh gần giống như bệnh hủy hoại gan tụy do vi khuẩn VP gây ra. Vì thế nghiên cứu tính đặc hiệu của một số cặp mồi ứng dụng trong bộ KIT phát hiện nhanh vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* trên tôm sú bằng phương pháp PCR đã được thực hiện để tìm cặp mồi đặc hiệu có khả năng phát hiện nhanh và chính xác VP mang tính cấp thiết cao.

2. Phương tiện và phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương tiện:

Mẫu thí nghiệm: DNA khuôn mẫu sử dụng cho các thí nghiệm khảo sát mồi là DNA plasmid đã được tinh sạch, có nồng độ gốc là 186,5 ng/µL, trình tự DNA của virus gây bệnh còi (MBV) và virus gây bệnh đốm trắng (WSSV) được lấy từ ngân hàng gen NCBI được tổng hợp và xác định

hàm lượng DNA do Công ty Trách nhiệm hữu hạn một thành viên sinh hóa PHUSA (Cty PHUSA) cung cấp. DNA mục tiêu sử dụng trong thí nghiệm ứng dụng phương pháp PCR để phát hiện VP là DNA ly trích từ các mẫu tôm trên thực tế.

Thiết bị: Máy PCR BIO-RAD T100, máy heatblock VWR Digital Moden 949035, máy vortex mini VWR Scientific Product, máy đo nồng độ DNA Nedovix DS-11, máy li tâm nhỏ Digital CD2012, máy chụp hình gel Major Scient MUVB100, bộ điện di BIO-RAD PowerPAC 300, cân điện tử, lò vi sóng, tủ lạnh và một số thiết bị cần thiết khác.

Hóa chất: Hóa chất ly trích DNA, hóa chất PCR gồm H₂O khử ion, *Taq* polymerase, dung dịch đệm PCR PSA buffer, dNTPs, DNA thang chuẩn Bio-2000 (DNA Ladder_DL), dung dịch điện di Tris-acetate EDTA 1X (TAE 1X), Ultra Clear Quick Dissolve Agarose, dye nhuộm DNA được sản xuất và cung cấp bởi công ty PHUSA.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Lựa chọn và thiết kế đoạn mồi cho phản ứng PCR là một trong những bước quan trọng quyết định đến kết quả của quy trình. Mồi được lựa chọn phải đặc trưng cho trình tự DNA cần khuếch đại, chiều dài của mồi khoảng 18-25 nucleotide, nhiệt độ nóng chảy (nhiệt độ biến tính) trong khoảng 60 °C – 65 °C, thành phần GC của đoạn mồi nằm trong khoảng 40 – 60% để nhiệt độ bắt cặp của mồi là không quá thấp, có ít nhất một G hoặc C ở đầu 3’ để giúp cho đầu 3’ của mồi liên kết mạnh hơn. Nhiệt độ nóng chảy của mồi xuôi và mồi ngược không cách nhau quá xa, vì nếu chênh lệch nhiệt độ lớn thì mồi có nhiệt độ biến tính (T_m) cao hơn sẽ gắn cặp không đặc hiệu, còn mồi có T_m thấp hơn sẽ không thể lai được với DNA. Chiều dài của sản phẩm khuếch đại khoảng 200 – 400 bp, nhiệt độ biến tính trong khoảng 80 – 85 °C (không bắt buộc). Theo nghiên cứu về dấu hiệu nhận biết trình tự gene của vi khuẩn VP ở mức độ loài bằng phương pháp PCR đối với gene đích là gen *toxR* của (Kim và cs., 1999) đã chỉ ra rằng gen *toxR* có trình tự bảo tồn cao nhất trong loài và có thể sử dụng dùng để phát hiện nhanh vi khuẩn VP trong các mẫu bệnh phẩm. Ba cặp mồi V1, V2, V3 dùng để xác định gen *toxR*, theo số hiệu gene L11929.1 trên cơ sở dữ liệu NCBI và nghiên cứu của (Kim và cs., 1999; Wong và cs., 1999) đã được khảo sát bảng 1.

Bảng 1. Danh sách các cặp mồi được chọn

Ký hiệu mồi	Trình tự (Mồi xuôi và mồi ngược)	T _m (°C)	GC (%)	Kích thước sản phẩm (base pair)
V1	5'-GTCTTCTGACGCAATCGTTG-3'	59	50	367
	5'-ATACGAGTGGTTGCTGTCATG-3'	58	48	
V2	5'-CTTTCTTCAGACTCAAGC-3'	56	45	394
	5'-AACGAGTCTTCTGCATGGTG-3'	58	50	
V3	5'-AGCCCGCTTTCTTCAGACTC-3'	61	55	398
	5'-AACGAGTCTTCTGCATGGTG-3'	58	50	

Các nghiên cứu được tiến hành 3 lần lặp lại. Sử dụng cơ sở dữ liệu của NCBI để thu nhận trình tự gen mục tiêu và phần mềm Primer3 version 0.4.0 để lựa chọn cặp mồi.

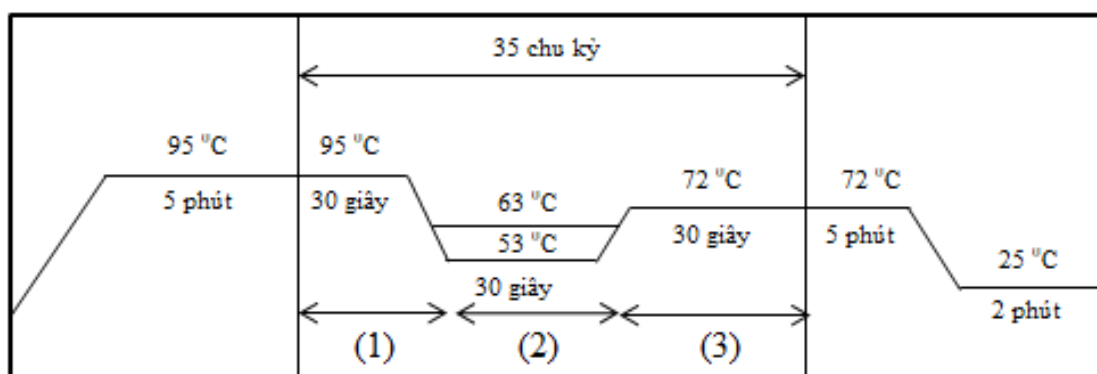
Khảo sát nhiệt độ bắt cặp của mồi nhằm lựa chọn nhiệt độ bắt cặp tối ưu cho mồi gắn vào DNA mạch khuôn. Nhiệt độ bắt cặp của mồi khảo sát ở 3 mức nhiệt độ lần lượt là 63°C, 58°C, 53°C.

Pha loãng mỗi ban đầu về nồng độ 10 µM bằng dung dịch TE 1X. Các thành phần tham gia phản ứng PCR tham khảo ở bảng 2.

Bảng 2. Thành phần tham gia phản ứng PCR khảo sát nhiệt độ gắn môi

Thành phần	Nồng độ gốc	Nồng độ 1 phản ứng	Thể tích một phản ứng 50 µL
H ₂ O khử ion			40,5
PSA buffer	10X	1X	5
dNTPs	10 mM	0,2 pmol	0,5
Taq polymerase	5 U	2 U	1
Cặp môi khảo sát	10 µM	0,2 µM	1
DNA VP	186,5 ng/µL	186,5 x10 ⁻³ ng/µL	2

Chu kỳ nhiệt trên máy PCR được thiết lập như hình 1



Hình 1. Chu kỳ nhiệt của PCR được thiết lập trong khảo sát nhiệt độ gắn môi

Trong đó, (1) là giai đoạn biến tính, (2) là giai đoạn gắn cặp, (3) là giai đoạn kéo dài. Sau khi phản ứng PCR kết thúc, tiến hành chạy điện di ở điện thế 90 V, cường độ 400 mA trong 45 phút sau đó đọc kết quả. Gel sử dụng để chạy điện di là gel agarose 2% hòa tan trong dung dịch TAE 1X.

Chỉ tiêu đánh giá: Sản phẩm có hiện băng đúng với kích thước của sản phẩm khuếch đại tương ứng với cặp môi khảo sát. Băng sản phẩm càng sáng rõ và càng đậm càng thể hiện nhiệt độ gắn môi thích hợp.

Kiểm tra độ đặc hiệu của môi: kiểm tra cặp môi có khuếch đại đúng trình tự DNA mục tiêu không nghĩa là cặp môi chỉ bắt cặp với trình tự DNA của vi khuẩn VP mà không bắt cặp với DNA của các virus gây bệnh khác. Trong nghiên cứu này đã khảo sát khả năng bắt cặp của từng cặp môi lên đoạn DNA của VP, MBV và WSSV.

Cách thực hiện: Sử dụng chu kỳ nhiệt đã tối ưu ở nghiên cứu nhiệt độ bắt cặp của môi và thành phần tham gia phản ứng (bảng 2) và thêm thành phần DNA của MRV và DNA của WSSV.

Chỉ tiêu đánh giá: Sản phẩm chỉ hiện băng sáng rõ của vi khuẩn VP, không xuất hiện băng đối với MBV và WSSV.

Khảo sát độ nhạy của môi: Độ nhạy của môi được kiểm tra ở các nồng độ pha loãng như bảng 3, mỗi nồng độ lặp lại 2 lần.

Bảng 3. Pha loãng nồng độ DNA mục tiêu.

Nồng độ mong muốn (ng/ μ L)	Pha loãng
$186,5 \times 10^{-2}$	198 μ L TE + 2 μ L DNA (186,5 ng)
$186,5 \times 10^{-3}$	180 μ L TE + 20 μ L DNA ($186,5 \times 10^{-2}$ ng)
$186,5 \times 10^{-4}$	180 μ L TE + 20 μ L DNA ($186,5 \times 10^{-3}$ ng)
$186,5 \times 10^{-5}$	180 μ L TE + 20 μ L DNA ($186,5 \times 10^{-4}$ ng)
$186,5 \times 10^{-6}$	180 μ L TE + 20 μ L DNA ($186,5 \times 10^{-5}$ ng)
$186,5 \times 10^{-7}$	180 μ L TE + 20 μ L DNA ($186,5 \times 10^{-6}$ ng)
$186,5 \times 10^{-8}$	180 μ L TE + 20 μ L DNA ($186,5 \times 10^{-7}$ ng)

Cách thực hiện: Tiến hành PCR mỗi với nồng độ giảm dần thể hiện trong bảng 3, sử dụng chu kỳ nhiệt đã tối ưu ở 58°C và thành phần tham gia phản ứng như bảng 2 có DNA plasmid VP được pha loãng ở các nồng độ như bảng 3.

Chỉ tiêu đánh giá: Sản phẩm PCR hiện bằng sáng rõ tương ứng với nồng độ sản phẩm khuếch đại của từng cặp môi. Nồng độ DNA mục tiêu càng giảm thì độ sáng, rõ và đậm của băng sản phẩm điện di cũng giảm dần. Nồng độ nhỏ nhất có thể nhìn thấy băng sản phẩm chính là độ nhạy của môi.

Ứng dụng cặp môi đặc hiệu trong bộ KIT để phát hiện mẫu tôm bệnh thu từ thực tế.

Ứng dụng cặp môi để phát hiện vi khuẩn VP có trong các mẫu tôm thu ở chợ Hưng Lợi, thành phố Cần Thơ và chợ Mỹ Xuyên, thành phố Long Xuyên tỉnh An Giang. Mỗi chợ thu mua 4 mẫu tôm, các mẫu tôm được ly trích DNA bằng bộ Kit-PHUSA, sử dụng máy đo OD (optical density) để xác định độ tinh sạch và đo nồng độ của DNA tôm ly trích, thành phần tham gia phản ứng PCR phát hiện vi khuẩn VP trên mẫu tôm như bảng 2 với lượng DNA của mỗi mẫu tôm là 2 μ L.

Chỉ tiêu đánh giá: nếu có vi khuẩn VP hiện diện trong các mẫu tôm kiểm tra thì sẽ xuất hiện băng sáng rõ trong kết quả điện di.

3. Kết quả và thảo luận

3.1 Kết quả nhiệt độ gắn môi của các cặp môi

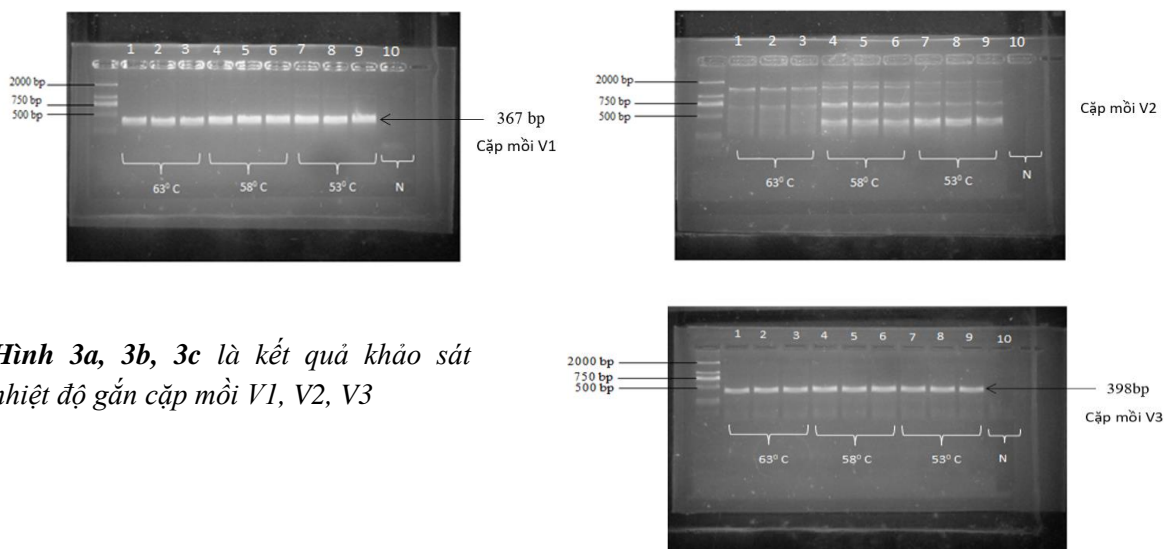
Khi thiết kế môi trên phần mềm Primer3, nhiệt độ gắn môi thích hợp của từng cặp môi cũng được thể hiện. Tuy nhiên một số trường hợp hóa chất hoặc hoạt động của từng loại máy PCR mà nhiệt độ gắn môi trên thực tế có thể sai khác so với lý thuyết phần mềm. Kết quả khảo sát nhiệt độ gắn môi V1, V2, và V3 được thể hiện trong hình 3a, 3b, 3c.

Nhiệt độ gắn môi của cặp môi V1 trên phần mềm Primer3 có nhiệt độ nóng chảy của môi xuôi là 59 °C, môi ngược là 58 °C. Tuy nhiên trong thực tế khảo sát V1 ở 3 mức nhiệt độ gắn môi là 63 °C, 58 °C và 53 °C, kết quả được thể hiện ở hình 3a, các băng hình đều ở kích thước 367 bp. Phản ứng PCR của môi V1 cho kết quả các băng hình đều sáng ở các mức nhiệt độ. Ở nhiệt độ 53 °C sản phẩm PCR có sản phẩm phụ nên không sử dụng làm cặp môi cho các nghiên cứu tiếp theo. Như vậy, nhiệt độ gắn môi thích hợp cho V1 là 63°C và 58°C. Điều này phù hợp với nghiên cứu trước đây của (Kim và cs., 1999) đã sử dụng nhiệt độ gắn môi là 63 °C cho cặp môi V1 để khảo sát khả năng gắn cặp của cặp môi này trên 14 chuỗi trình tự của của 14 chủng vi khuẩn VP. Tương tự, một nghiên cứu khác của (Zulkifli và cs., 2009) cũng sử dụng cặp môi V1 để kiểm tra trên 48 chủng

vi khuẩn *Vibrio* trong đó có chứa 14 chủng có gene *toxR* và 34 chủng còn lại chứa gene *trh*, *tdh*. Trong nghiên cứu khảo sát nhiệt độ gắn môi, (Zulkifli và cs., 2009) đã sử dụng nhiệt độ ở 63 °C đã cho kết quả băng hình sáng rõ tương tự như kết quả của (Kim và cs., 1999) trước đó. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phát hiện thêm là ở 58°C các băng hình có độ sáng rõ hơn ở nhiệt độ 63°C và không có sản phẩm phụ như ở 53°C. Nhiệt độ 58°C gắn môi thích hợp của V1 theo cơ sở dữ liệu của NCBI và phần mềm thiết kế đoạn môi Primer3. Vì thế, nhiệt độ gắn môi 58°C đã được chọn là nhiệt độ gắn môi thích hợp nhất cho V1.

Nhiệt độ gắn môi của cặp môi V2, sau khi tham khảo nhiệt độ gắn môi của cặp môi V2 trên phần mềm Primer3, nghiên cứu của (Kim và cs., 1999) và kết quả từ nghiên cứu này cho thấy V2 không là cặp môi đặc hiệu trong phát hiện vi khuẩn VP vì ở cả ba mức nhiệt độ 63 °C, 58 °C và 53 °C sản phẩm PCR đều có rất nhiều sản phẩm phụ, băng hình không sáng rõ ở hình 3b. Do đó cặp môi V2 không được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Nhiệt độ gắn môi của cặp môi V3 được thể hiện trong hình 3c. Cả ba mức nhiệt độ sản phẩm PCR đều có băng hình sáng rõ, tương ứng với kích thước của sản phẩm khuếch đại 398 bp. Độ sáng của các băng tương đối giống nhau, V3 có thể sử dụng cả ba mức nhiệt độ 63°C, 58°C và 53°C để thực hiện phản ứng PCR. Tuy nhiên, do nhiệt độ nóng chảy trung bình của môi xuôi và môi ngược V3 là 59.5°C (bảng 1) vì thế cần phải chọn nhiệt độ gắn môi gần với nhiệt độ nóng chảy nhất nên nhiệt độ 58°C được chọn là nhiệt độ gắn môi cho V3 ở các khảo sát tiếp theo. Hai cặp môi V1 và V3 với nhiệt độ gắn môi là 58°C được tiến hành khảo sát độ đặc hiệu của môi.



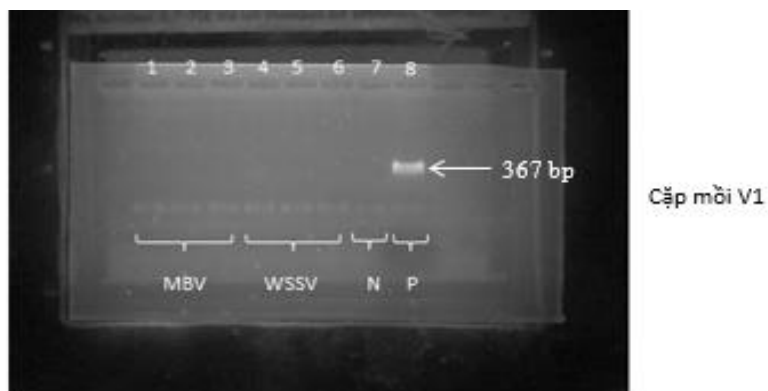
Hình 3a, 3b, 3c là kết quả khảo sát nhiệt độ gắn cặp môi V1, V2, V3

Trong đó: Các giếng 1, 2, 3 là kết quả khảo sát môi ở 63 °C; giếng 4, 5, 6 môi ở 58 °C; giếng 7, 8, 9 môi ở 53 °C; giếng 10 là đối chứng âm.

3.2. Kết quả kiểm tra độ đặc hiệu của môi

DNA của virus gây bệnh còi (MBV) và virus gây bệnh đốm trắng (WSSV) được sử dụng làm đối chứng vì biểu hiện bệnh do hai virus này rất giống với biểu hiện bệnh do vi khuẩn VP gây ra. Cặp môi sử dụng trong bộ KIT để phát hiện nhanh và chính xác VP phải là môi đặc hiệu chỉ gắn cặp với DNA của VP mà không bắt cặp với DNA hai loại virus khác. Kết quả khảo sát gắn cặp đặc hiệu của môi được thể hiện như hình 4a và 4b bên dưới.

Kết quả độ đặc hiệu của cặp mồi V1: Hình 4a là kết quả kiểm tra độ đặc hiệu của cặp mồi V1. Trong đó, giếng 1, 2, 3 là kết quả khảo sát khả năng gắn mồi lên DNA của virus gây bệnh còi (MBV); giếng 4, 5, 6 là kết quả gắn mồi lên virus gây bệnh đốm trắng (WSSV); giếng 7 là đối chứng âm (nước cất) và giếng 8 là đối chứng dương (vi khuẩn VP).

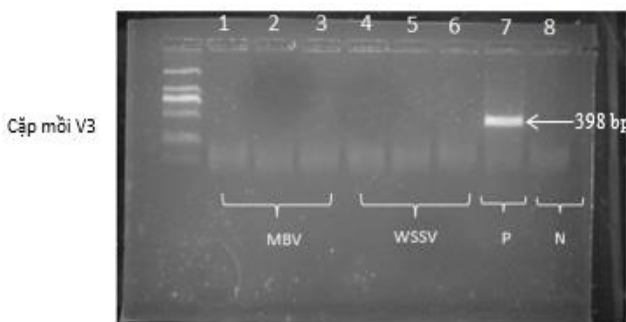


Hình 4a. Kết quả kiểm tra độ đặc hiệu của cặp mồi V1

Từ hình 4a cho thấy, cặp mồi V1 chỉ bắt cặp với trình tự DNA của VP mà không bắt cặp với DNA của các virus MBV và WSSV. Nghiên cứu của (Kim và cs., 1999) đã sử dụng cặp mồi V1 để thử nghiệm khả năng bắt cặp của cặp mồi V1 với DNA của 14 loài *Vibrio* khác nhau bao gồm *V. cholerae* O1 NIH41, *V. cholerae* O1 NIH35A3, *V. cholerae* O139, *V. cholerae* non-O1, *V. hollisae*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. furnisii*, *V. damsela*, *V. metchnikovii*, kết quả cho thấy ngoài việc không bắt cặp với DNA của các virus MBV, WSSV cặp mồi V1 cũng không bắt cặp với trình tự DNA của 14 loài vi khuẩn *Vibrio* kể trên. Tương tự, trong nghiên cứu của (Zulkifli và cs., 2009) đã sử dụng cặp mồi V1 để nhận diện vi khuẩn VP kết quả kiểm tra trên 48 chủng vi khuẩn *Vibrio* trong đó chỉ có 14 chủng chứa gene *toxR* và 34 chủng còn lại chứa gene *trh*, *tdh* như vậy cho thấy cặp mồi V1 chỉ bắt cặp lên trình tự gen của 14 chủng có chứa gene *toxR*. Do đó cặp mồi V1 có thể dùng để phát hiện vi khuẩn VP một cách chuyên biệt.

Kết quả độ đặc hiệu của cặp mồi V3 được thể hiện trong hình 4b. Cặp mồi V3 chỉ bắt cặp với trình tự DNA của VP mà không bắt cặp với DNA của các virus gây bệnh khác. Cả hai cặp mồi V1 và V3 đều không bắt cặp với trình tự DNA của MBV và WSSV, điều này cho thấy cả hai mồi đều đặc hiệu với vi khuẩn VP được sử dụng để phát hiện VP. Tuy nhiên, độ nhạy của mồi là một trong những yếu tố cần thiết mang tính đặc hiệu của mồi vì thế cần tiến hành khảo sát độ nhạy của mồi để chọn cặp mồi tối ưu nhất.

Hình 4b. Kết quả kiểm tra độ đặc hiệu của cặp mồi V3

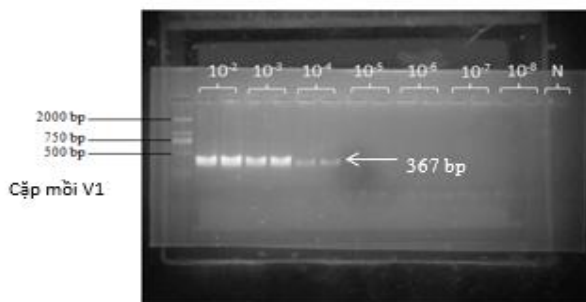


3.3. Kết quả khảo sát độ nhạy của môi

Độ nhạy của môi là yếu tố rất quan trọng trong bộ KIT vì độ nhạy của môi chính là độ nhạy của KIT. Độ nhạy được hiểu là nồng độ DNA của VP thấp nhất mà môi có thể nhận biết, gắn cặp và khuếch đại để cho kết quả điện di có băng hình sáng rõ. Cặp môi có độ nhạy cao hơn tức là cho kết quả điện di có băng hình sáng rõ hơn ở nồng độ DNA thấp hơn.

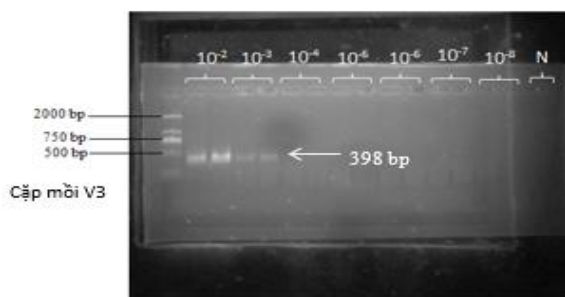
Kết quả độ nhạy của cặp môi V1

Phản ứng PCR sử dụng nồng độ DNA vi khuẩn ban đầu là 186,5 ng/μL, sau đó pha loãng nồng độ từ 186,5x10⁻² ng/μL đến 186,5x10⁻⁸ ng/μL, kết quả điện di cho thấy độ nhạy của cặp môi V1 và V3 được thể hiện trong hình 5a, 5b.



Hình 5a, 5b. Kết quả khảo sát độ nhạy của cặp môi V1 và V3

Trong đó: N là đối chứng âm, các giếng còn lại là nồng độ DNA vi khuẩn đã được pha loãng từ 186,5x10⁻² ng/μL đến 186,5x10⁻⁸ ng/μL, các mẫu được lặp lại 2 lần.



Các giếng có băng sản phẩm ở khoảng 367 bp, các băng có độ đậm, sáng rõ giảm dần theo nồng độ của DNA ban đầu. Điều này cho thấy trong cùng một thời gian và số chu kỳ khuếch đại PCR nhưng ở nồng độ DNA mạch khuôn cao thì môi dễ dàng gắn cặp và khuếch đại số lượng lớn sản phẩm DNA nên băng hình sáng rõ và dễ dàng nhận thấy. Ngược lại, ở nồng độ DNA ban đầu thấp, số lượng mạch khuôn hiện diện trong dung dịch phản ứng thấp, nên sự gắn cặp và khuếch đại đoạn DNA giảm dần và sự biểu hiện của băng trên gel điện di cũng sẽ mờ dần.

Vì thế độ sáng rõ của băng trên gel điện di mà có thể quan sát được sáng rõ tại nồng độ đó được xem là nồng độ tối thiểu mà cặp môi có thể bắt cặp và khuếch đại hay được gọi là độ nhạy của môi tại nồng độ pha loãng đó, vì sau nồng độ pha loãng này thì cặp môi không hoạt động sẽ cho kết quả là băng sẽ sáng mờ hoặc không thể nhìn thấy được. Kết quả từ gel điện di cho thấy ở nồng độ mẫu là 186,5x10⁻² ng/μL – 186,5x10⁻⁴ ng/μL vẫn có thể nhìn thấy rõ tín hiệu của các băng hình, đến nồng độ 186,5x10⁻⁵ ng/μL thì băng mờ nhiều và các nồng độ thấp hơn trở về sau thì không còn thấy xuất hiện băng. Như vậy độ nhạy của phản ứng là 186,5x10⁻⁴ ng/μL.

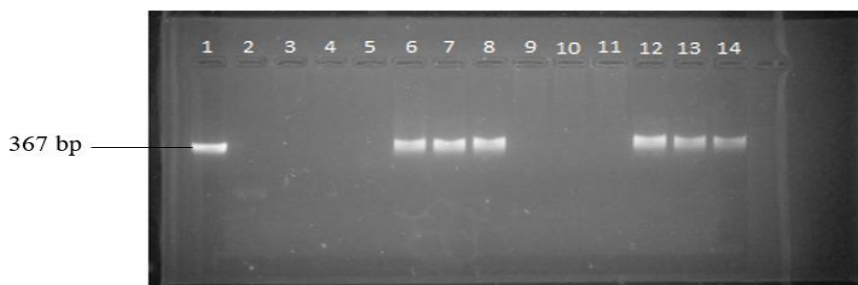
Kết quả độ nhạy của cặp môi V3:

Từ hình 5b nhận thấy ở nồng độ mẫu 186,5x 10⁻³ ng/μL băng hình vẫn có thể nhìn thấy sáng, các nồng độ thấp hơn thì không thấy xuất hiện băng sáng. Như vậy, độ nhạy của phản ứng là 186,5x10⁻³ ng/μL.

Từ nghiên cứu này cho thấy cùng một nồng độ pha loãng của DNA khuôn mẫu ban đầu, cùng một thời gian và chu kỳ khuếch đại trên PCR, cặp môi V1 gắn cặp với DNA khuôn mẫu tốt hơn và cho số lượng DNA khuếch đại nhiều hơn từ đó băng hình biểu hiện sáng rõ hơn ở nồng độ thấp hơn 186,5x10⁻⁴ ng/μL. Như vậy, cặp môi V1 là cặp môi thích hợp nhất được chọn để tham gia vào KIT phát hiện nhanh vi khuẩn VP.

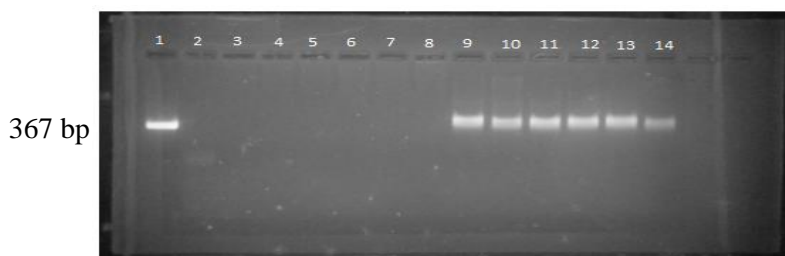
3.4. Kết quả ứng dụng KIT để kiểm tra mẫu tôm bệnh từ thực tế

Trong 8 mẫu tôm thu mua từ chợ, bốn mẫu tôm được thu từ chợ Hưng Lợi phát hiện có 2 mẫu tôm nhiễm VP là mẫu 2 và 4 (hình 6a) và bốn mẫu tôm thu mua từ chợ Mỹ Xuyên cũng có 2 mẫu tôm nhiễm VP là mẫu 3 và 4 (hình 6b). Cả hai chợ đều có tỉ lệ tôm nhiễm VP chiếm 50% trong tổng số tôm kiểm tra. Dựa vào độ sáng của băng hình cho thấy mức độ nhiễm VP giữa các mẫu khác nhau ở hình 6a, mẫu 4 nhiễm thấp hơn mẫu 2 do băng hình không sáng rõ. Ở hình 6b, do lần lặp lại thứ ba của mẫu 4 khi bơm DNA vào giếng một phần hỗn hợp bị tràn ra ngoài dẫn đến kết quả băng hình mờ hơn một ít so với hai băng còn lại.



Hình 6a. Kết quả kiểm tra vi khuẩn VP trên các mẫu tôm tại chợ Hưng Lợi

Trong đó: giếng 1: đối chứng dương; giếng 2 : đối chứng âm; lần lượt các giếng 3, 4, 5 là kết quả kiểm tra trên mẫu tôm thứ nhất; giếng 6, 7, 8 kết quả mẫu tôm thứ 2, giếng 9, 10, 11 kết quả mẫu tôm thứ 3 và ba giếng 12, 13, 14 kết quả mẫu tôm thứ 4.



Hình 6b. Kết quả kiểm tra vi khuẩn VP trên các mẫu tôm tại chợ Mỹ Xuyên

Trong đó: giếng 1 là đối chứng dương (vi khuẩn VP); giếng 2 là đối chứng âm (nước cất); giếng 3, 4, 5 là kết quả kiểm tra VP trên mẫu tôm thứ nhất; giếng 6, 7, 8 trên mẫu tôm thứ 2, giếng 9, 10, 11 trên mẫu tôm thứ 3 và giếng 12, 13, 14 trên mẫu tôm thứ 4.

Ứng dụng KIT phát hiện vi khuẩn VP trên tám mẫu tôm tại hai chợ Hưng Lợi và Mỹ Xuyên với số lần lặp lại là ba cho thấy đã có bốn mẫu tôm phát hiện nhiễm vi khuẩn VP, chiếm 50% trong tổng số tôm được khảo sát.

4. Kết luận

Cặp mồi V1 có trình tự mồi xuôi là 5'-GTCTTCTGACGCAATCGTTG-3'; mồi ngược là 5'-ATACGAGTGGTTGCTGTCATG-3' đã đáp ứng là mồi đặc hiệu cho phản ứng PCR phát hiện vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* trên tôm. Cặp mồi này cũng thỏa mãn các yêu cầu cơ bản như: chiều dài từ 18-24 nucleotide; trình tự mồi hoàn toàn ngẫu nhiên với tỉ lệ GC từ 48 - 50%; có G ở

đầu 3'; nhiệt độ gắn mỗi thích hợp là 58°C; nhiệt độ biến tính của hai môi xuôi và ngược không chênh lệch nhau quá 2°C; không bắt cặp lên trình tự DNA của virus MBV, WSSV; độ nhạy phát hiện vi khuẩn VP ở nồng độ DNA pha loãng $186,5 \times 10^{-4}$ ng/ μ L nên được sử dụng làm cặp môi đặc hiệu trong bộ KIT phát hiện nhanh vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* (VP) trên tôm Sú.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. Lightner, C. Redman, B. Pantoja, L. Noble, L. T. Nunan, and L. Tran (2013). Documentation of an Emerging Disease (early mortality syndrome) in SE Asia & Mexico. *OIE Reference Laboratory for Shrimp Diseases, Department of Veterinary Science & Microbiology, School of Animal and Comparative Biomedical Sciences*.
- [2] H. C. Wong, M. C. Chen, S. H. Liu, and D. P. Liu (1999). Incidence of highly genetically diversified *Vibrio parahaemolyticus* in seafood imported from Asian countries. *International Journal of Food Microbiology*, 52(3),181-188, doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00143-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00143-9).
- [3] L. T. Trần (ed, 2006). Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm (mỹ phẩm).
- [4] M. Mirbakhsh, M. Afsharnasab, A. Khanafari, and M. Razavi (2014). Molecular identification of *Vibrio harveyi* from larval stage of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Boone (Crustacea: Decapoda) by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 13(2), 384-393.
- [5] M. Zorriehzahra and R. Banaederakhshan (2015). Early mortality syndrome (EMS) as new emerging threat in shrimp industry. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 3(2S), 64-72.
- [6] N. A. Daniels *et al.* (2000). *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973–1998. *The Journal of infectious diseases*, 181(5), 1661-1666.
- [7] R. Sirikharin *et al.* (2015). Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *PloS one*, 10(5), e0126987.
- [8] Y. B. Kim, J. Okuda, C. Matsumoto, N. Takahashi, S. Hashimoto, and M. Nishibuchi (1999). Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(4), 1173-1177.
- [9] Y. Zulkifli, N. Alitheen, R. Son, S. Yeap, M. Lesley, and A. Raha (2009). Identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolates by PCR targeted to the *toxR* gene and detection of virulence genes. *International Food Research Journal*, 16, 289-296.