

PHÁT TRIỂN QUI TRÌNH MRT-PCR PHÁT HIỆN GAV (Gill-associated virus) VÀ BETA-ACTIN Ở TÔM SÚ

Trần Việt Tiên¹, Trần Thị Mỹ Duyên¹ và Đặng Thị Hoàng Oanh¹

ABSTRACT

*Multiplex RT-PCR protocol was developed to detect GAV and Beta-actin endogenous gene of black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Six GAV positive samples which were detected by IQ2000 YHV/GAV protocol were used to test with protocol of Cowley et al. (2000). The multiplex RT-PCR was then developed in combination of protocol for beta actin detection of Oanh (2007) to obtain PCR products of 317 bp for GAV and 216 bp for beta actin. This optimized protocol can now be used for GAV detection in *P. monodon* in our laboratory.*

Keywords: GAV, RT-PCR, *Penaeus monodon*

Title: Development of multiplex RT-PCR to detect GAV and beta actin of *Penaeus monodon*

TÓM TẮT

Qui trình được thực hiện nhằm ứng dụng phương pháp RT-PCR để phát hiện GAV trên tôm sú giống có sử dụng nội chuẩn Beta-actin. Sáu mẫu dương tính với GAV phân tích bằng kit IQ2000 YHV/GAV được chọn để thực hiện qui trình phát hiện GAV của Cowley et al. (2000). Sau đó kết hợp qui trình RT-PCR của Cowley et al., (2000) và qui trình RT-PCR phát hiện gen Beta-actin của Oanh (2007) phát hiện đồng thời gen Beta-actin của tôm (216 bp) và GAV (317 bp). Qui trình được chuẩn hoá có thể ứng dụng trong nghiên cứu và xét nghiệm GAV trên tôm sú tại Khoa Thủy sản.

Từ khóa: GAV, RT-PCR, *Penaeus monodon*

1 GIỚI THIỆU

Sự phát triển nhanh của nghề nuôi tôm đã đem lại lợi ích đáng kể về mặt kinh tế và xã hội. Tuy nhiên nghề nuôi tôm hiện đang phải đương đầu với nhiều loại bệnh xuất hiện trong quá trình nuôi tôm nhất là bệnh do vi-rút gây ra như vi-rút gây bệnh đốm trắng (white spot syndrome virus - WSSV), vi-rút gây hội chứng Taura (Taura syndrome virus - TSV), vi rút gây bệnh đầu vàng (yellow head virus - YHV) và vi rút gây bệnh mang (gill-associated virus - GAV). Do chưa có thuốc chữa trị đặc hiệu nên công tác phòng ngừa và chẩn đoán bệnh sớm là rất cần thiết. Các phương pháp chẩn đoán truyền thống như quan sát dấu hiệu bệnh hay phương pháp mô bệnh học không cho phép phát hiện sớm và chính xác tác nhân gây bệnh. Nhiều phương pháp phân tử như lai *in situ*, western blot, PCR, RT-PCR được phát triển nhằm khắc phục những nhược điểm trên. Phương pháp PCR hiện đang được sử dụng rất rộng rãi và hiệu quả trong việc xét nghiệm tôm giống. Tuy nhiên một trong những hạn chế đáng kể của PCR là hiện tượng âm tính giả. Trong số các qui trình PCR phát hiện vi-rút trên tôm được sử dụng thường không có nội chuẩn nhằm kiểm soát trường hợp âm tính giả. Để từng bước khắc phục vấn đề này và cũng để thực hiện qui trình RT-PCR phát hiện GAV tại Khoa Thủy sản chúng tôi phát triển qui trình mRT-PCR phát hiện đồng thời GAV và gen Beta-actin của tôm sú để xác định các trường hợp âm tính giả và nâng cao tính chính xác của qui trình xét nghiệm.

¹ Bộ Môn Sinh học và Bệnh thủy sản, Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Một trăm sáu mươi chín mẫu tôm giống cỡ Pl 12-15 được xét nghiệm tại Khoa Thủy sản từ tháng 02–05/2007 bằng phương pháp PCR hai bước sử dụng kit IQ2000 YHV/GAV. Mẫu tôm được thu và vận chuyển trong túi nylon 2 lớp có bơm oxy mỗi túi có 100-200 tôm giống.

Thao tác ly trích ARN và khuếch đại phát hiện GAV được thực hiện theo qui trình hướng dẫn của Công ty Farming Intelligene Technology Corperation, Đài Loan. Nguồn vi-rút sử dụng làm đối chứng dương được ly trích từ tôm nhiễm GAV ở Úc.

2.2 Qui trình RT- PCR phát hiện GAV

Mẫu tôm dương tính với GAV theo kit IQ2000YHV/GAV được sử dụng để thực hiện qui trình RT-PCR phát hiện GAV theo Cowley *et al.*, (2000).

2.2.1 Ly trích ARN

Cho 50-100 mg mẫu vào ống eppendorf 1,5 ml có chứa 750 μ l Trizol (Invitrogen). Nghiền mẫu và giữ ở nhiệt độ phòng 5 phút. Ly tâm 12000 vòng trong 10 phút để tạo phân viên. Chuyển dịch trong sang một ống eppendorf mới. Thêm 200 μ l chloroform/1ml Trizol. Lắc cẩn thận bằng tay trong 15 giây. Ủ ở 15-30⁰C từ 2-3 phút. Ly tâm 12.000 vòng trong 15 phút. Chuyển phần trong phía trên sang một ống eppendorf 1,5 ml mới. Thêm 500 μ l isopropanol/1ml Trizol. Ủ ở 15-30⁰C trong 10 phút. Ly tâm 12.000 vòng 10 phút, sau đó rút bỏ isopropanol. Rửa phần viên bằng ethanol 75 % (sử dụng 1ml ethanol 75% cho 1ml Trizol). Trộn đều bằng vortex và ly tâm 7.500 vòng trong 5 phút, sau đó làm khô phần viên. Hòa tan phần viên với 40 μ l nước cất và trữ ở -80⁰C.

2.2.2 Tạo cDNA:

Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng RT-PCR

- Hỗn hợp A: ARN được ly trích từ mẫu tôm bệnh được đo và pha loãng ở hàm lượng 200 ng/ μ l. Thành phần hóa chất hỗn hợp A gồm có 0,5 μ l dNTP (10mM) ; 1 μ l mỗi random hexamer (50 ng/ μ l); 5 μ l ARN (200ng/ μ l) ; 0,5 μ l nước cất. Hỗn hợp được ủ 65⁰C trong 5 phút, sau đó giữ trong nước đá 5 phút rồi để ở nhiệt độ 20⁰C – 25⁰C.
- Hỗn hợp B: Thành phần hóa chất gồm có 2 μ l dung dịch đệm 5X; 0,5 μ l DDT và 0,5 μ l supper reverse transcriptase III. Hỗn hợp được ủ 42⁰C trong 5 phút, sau đó giữ ở nhiệt độ 20⁰C – 25⁰C trong 5 phút rồi giữ ở 4⁰C.
- Trộn hỗn hợp A và B và tổng hợp cDNA trong điều kiện nhiệt độ là 25⁰C trong 7 phút, 55⁰C trong 50 phút , 70⁰C trong 15 phút và giữ ở 20⁰C.

2.2.3 Khuếch đại ADN

- PCR bước 1: Thành phần hóa chất phản ứng khuếch đại bước 1 của qui trình Cowley *et al.*, (2000) gồm 2,5 μ l dung dịch đệm 10X; 2,5 μ l MgCl₂ (50 mM); 0,5 μ l dNTPs (10mM); 0,25 μ l Taq ADN polymerase 5UI/ μ l; 15,75 μ l nước; 2,5 μ l mỗi GAV 5/6 (25pmol) và 1 μ l sản phẩm sao mã ngược. Chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 94⁰C trong 1 phút; sau đó 94⁰C trong 30 giây, 58⁰C trong 30 giây, 72⁰C trong 40 giây; lặp lại chu kì trên 35 lần; 72⁰C trong 7 phút; giữ 20⁰C trong 10 phút.
- PCR bước 2: Thành phần hóa chất phản ứng khuếch đại bước 2 của qui trình Cowley *et al.*, (2000) gồm có 2,5 μ l dung dịch đệm 10X; 1,5 μ l MgCl₂ (50 mM); 0,5 μ l dNTPs (10mM); 0,25 μ l Taq ADN polymerase 5UI/ μ l; 14,75 μ l nước; 2,5 μ l mỗi GAV 1/2 (25pmol); 2 μ l sản phẩm sao mã ngược. Chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 94⁰C trong 1 phút; sau đó 94⁰C trong 30 giây, 58⁰C trong 30 giây, 72⁰C trong 45 giây; lặp lại chu kì trên 35 lần; 72⁰C trong 7 phút; giữ 20⁰C trong 10 phút.

2.2.4 Đọc kết quả

10 µl sản phẩm PCR được chạy điện di trên gel 1.5% agarose (ABgene, UK) trong dung dịch đệm ×1 TAE (10 mM Tris, 5 mM acetate, 0.1 mM EDTA). Kết quả điện di được ghi nhận bằng máy đọc gel Vilber Lourmat (Pháp). Thang ADN 1 kb plus (Invitrogen) được chạy chung với mẫu để xác định kích thước của các vạch ADN. Mẫu hiện lên vạch 317 bp là mẫu dương tính với GAV.

2.3 Qui trình RT-PCR phát hiện gen Beta-actin ở tôm

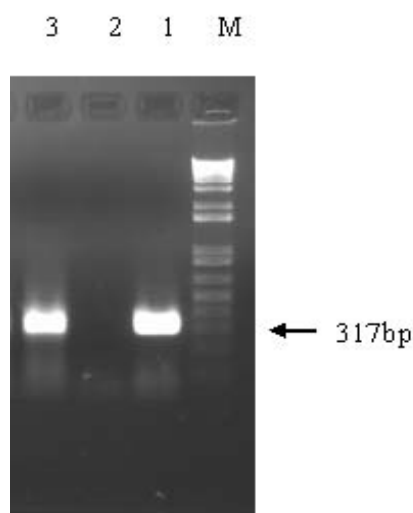
Thành phần hóa chất khuếch đại qui trình RT-PCR phát hiện gen Beta-actin (Oanh, 2007) gồm có 2,5 µl dung dịch đệm 10X; 2,5 µl MgCl₂ (50 mM); 0,5 µl dNTPs (10mM); 0,25 µl Taq ADN polymerase 5UI/µl; 15,75 µl nước; 1,25 µl mỗi Beta-actin F (25pmol); 1,25 µl mỗi Beta-actin R (25pmol); 1 µl sản phẩm sao mã ngược. Chu kỳ nhiệt của phản ứng là: 94⁰C trong 1 phút; sau đó 94⁰C trong 25 giây, 58⁰C trong 30 giây, 72⁰C trong 30 giây; lặp lại chu kì trên 35 lần ;72⁰C trong 7 phút; Giữ 20⁰C trong 20 phút. Mẫu hiện lên vạch 216 bp là gen Beta-actin của tôm.

2.4 Qui trình mRT-PCR phát hiện đồng thời GAV và Beta-actin

Thành phần hóa chất tham gia vào phản ứng khuếch đại qui trình mRT-PCR phát hiện GAV và Beta-actin trên tôm gồm có 2,5 µl dung dịch đệm 10X; 2,5 µl MgCl₂ (50 mM); 0,5 µl dNTPs (10mM); 0,25 µl Taq ADN polymerase 5UI/µl; 12,25 µl nước; 2,5 µl mỗi GAV 1/2 (25pmol); 1,25 µl mỗi Beta-actin F (25pmol); 1,25 µl mỗi Beta-actin R (25pmol); 2 µl sản phẩm sao mã ngược. Chu kỳ nhiệt của phản ứng là 94⁰C trong 1 phút; sau đó 94⁰C trong 30 giây, 58⁰C trong 30 giây, 72⁰C trong 45 giây; lặp lại chu kì trên 35 lần; 72⁰C trong 7 phút; giữ 20⁰C trong 10 phút.

3 KẾT QUẢ

3.1 Thực hiện qui trình RT-PCR phát hiện GAV trên tôm sú theo phương pháp của Cowley



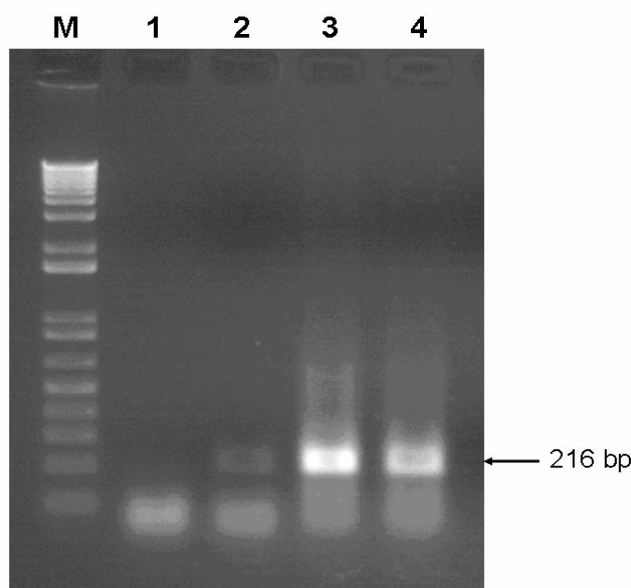
Hình 1: Kết quả PCR phát hiện GAV theo qui trình RT-PCR (Cowley *et al.*, 2000) M: Thang đo; 1: Đối chứng dương; 2: Đối chứng âm (nước); 3: Mẫu nhiễm GAV

Trong thời gian từ tháng 2-5/2007 phân tích 169 mẫu tôm sú giống tại phòng thí nghiệm với kit IQ2000 YHV/GAV đã phát hiện được 18 mẫu tôm nhiễm GAV. Sáu mẫu trong số này được chọn ra để ly trích ARN. Hàm lượng ARN ly trích được pha loãng mẫu ở hàm lượng 200 ng ARN/µl để thực hiện qui trình RT-PCR theo Cowley *et al.*, (2000). Kết quả

điện di (Hình 1) cho thấy sản phẩm PCR có kích thước 317bp giống như đối chứng dương, kết quả hoàn toàn phù hợp với kết quả của Cowley *et al.*, (2000).

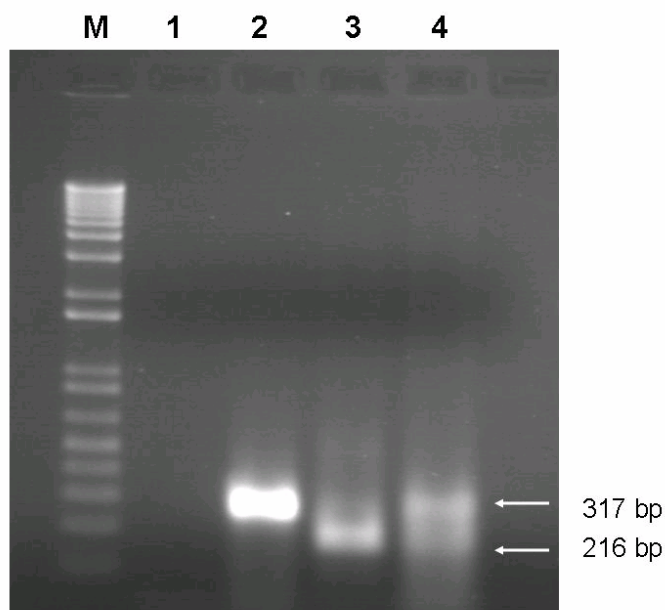
3.2 Thực hiện qui trình RT-PCR phát hiện gen Beta-actin của tôm

Sau khi thực hiện qui trình phát hiện GAV, qui trình phát hiện gen Beta-actin của tôm được thực hiện bằng cách sử dụng môi Beta-actin. Chọn ngẫu nhiên mẫu 123 và 124 để tiến hành qui trình. Kết quả cho thấy đã phát hiện được gen Beta-actin của tôm ở cả hai mẫu thử vị trí 216 bp giống như đối chứng dương, kết quả hoàn toàn phù hợp với kết quả của Oanh (2007).



Hình 2: Kết quả chạy PCR theo qui trình RT-PCR phát hiện gen. Beta-actin (Oanh, 2007) M: Thang đo; 1: Đối chứng âm (nước); 2: Đối chứng dương; 3 và 4: vạch chỉ gen Beta-actin của tôm tương ứng với mẫu 123 và 124

3.3 Thực hiện qui trình mRT-PCR phát hiện đồng thời GAV và Beta-actin



Hình 3: Kết quả chạy PCR theo qui trình mRT-PCR phát hiện GAV và Beta-actin trên tôm. Giếng M: thang đo; giếng 1: đối chứng âm; Giếng 2: mẫu chạy theo qui trình RT-PCR (Cowley *et al.*, 2000); Giếng 3: mẫu chạy theo qui trình RT-PCR phát hiện gen Beta-actin (Oanh, 2007); Giếng 4: mẫu chạy theo qui trình mRT-PCR phát hiện GAV và Beta-actin tôm

Kết quả điện di (Hình 3) cho thấy khi chạy với qui trình mRT-PCR phát hiện đồng thời GAV và Beta-actin của tôm thì ở giếng 4 sẽ hiện 2 vạch tương ứng 317 bp (GAV) và 216 bp (Beta-actin).

4 THẢO LUẬN

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 RT-PCR (Cowley *et al.*, 2000) phát hiện GAV trên tôm và qui trình RT-PCR phát hiện gen Beta-actin (Oanh, 2007) của tôm, qui trình mRT-PCR kết hợp 2 qui trình trên được thực hiện đã phát hiện đồng thời GAV ở vị trí 317 bp và Beta-actin ở vị trí 216 bp. Từ kết quả đạt được cho thấy qui trình có thể ứng dụng để phát hiện GAV và nhằm kiểm soát chất lượng ARN của tôm trong quá trình phát hiện GAV thông qua gen nội sinh Beta-actin.

5 KẾT LUẬN

Thực hiện qui trình RT-PCR phát hiện GAV theo Cowley *et al.*, (2000), sản phẩm PCR cho kết quả ở 317 bp. Khả năng ứng dụng tốt của qui trình mRT-PCR phát hiện đồng thời GAV (vị trí 317 bp) và Beta -actin của tôm (ở vị trí 216 bp). Mặc khác qui trình khá ổn định có thể sử dụng trong điều kiện phòng thí nghiệm của Khoa Thủy sản và có khả năng thay thế kit IQ2000 trong việc chẩn đoán phát hiện GAV trên tôm.

LỜI CẢM TẠ

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, Đại học Cần Thơ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cowley, J.A., C.M. Dimmock, K.M. Spann, P.J. Walker. 2000. Detection of Australian gill-associated virus (GAV) and lymphoid organ virus (LOV) of *Penaeus monodon* by RT-nested PCR amplification. *Dis Aquat Org.* 39: 159-167
- Dang Thi Hoang Oanh, 2007. RNA interference in Penaeid prawns. PhD thesis, School of Molecular and Microbial Sciences, The University of Queensland, Australia.
- Phan Quốc Việt, Nguyễn Hoàng Chương, Phạm Anh Tuấn, Nguyễn Văn Hào, Hồ Huỳnh Thùy Dương. 2003. Phát hiện vi-rút gây bệnh đầu vàng bằng phương pháp RT-PCR. *Tạp chí di truyền và ứng dụng.* Số 2 : 1-4
- Spann K.M., J.A. Cowley, P.J. Walker and R.J.G (1997). A Yellow head like virus from *Penaeus monodon* culture in Australia. *Dis. Aquat. Org* 31: 169-179