

## SỬ DỤNG KỸ THUẬT REALTIME RT-PCR VỚI SYBR GREEN ĐỂ XÁC ĐỊNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG VIRUS YHV GÂY NHIỄM BỆNH Ở TÔM

Vũ Thị Ngọc Bích, Nguyễn Kim Độ, Trịnh Quý Bôn, Bạch Như Quỳnh,  
Đình Duy Kháng, Đình Thương Vân

*Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

### Tóm tắt

Bệnh virus đầu vàng (YHD) gây bệnh ở tôm sú (*Penaeus monodon*) được mô tả lần đầu tiên năm 1990 tại Thái Lan làm thiệt hại tới 60% tổng số tôm nuôi. Bệnh này gây thiệt hại lớn cho tôm nuôi tại miền Trung và miền Nam Thái Lan năm 1992. Tỷ lệ gây chết ở tôm sau khi mắc bệnh từ 3 đến 5 ngày là 100%. Biểu hiện của bệnh là mang và gan tụy có màu vàng nhạt, toàn thân có màu nhợt nhạt. Triệu chứng lâm sàng của bệnh: Tôm bơi một cách khác thường trên bề mặt của nước, tôm kém ăn, trên phần đầu của tôm xuất hiện màu vàng sáng.

Năm 1992, bằng phương pháp mô học, S. Boonyaratpalin đã rút ra một số kết luận về nhân tố gây nên bệnh đầu vàng ở tôm như sau: Nhân tố gây bệnh là do virus (YHV), virus này có nhiều đặc điểm giống với bacilliform, cấu tạo bởi hai đơn vị cấu trúc là nucleocapsid và vỏ bao bọc. Chúng sinh sản trong tế bào chất của tế bào chủ.

Năm 1995, Wongteerasupaya và cộng sự kết luận rằng genom của YHV là RNA sợi đơn. Năm 1997, bằng việc sử dụng phương pháp SDS-PAGE gel, Nalada và cộng sự đã phân tích cấu trúc, kích thước của 4 loại protein do hệ genom của nó mã hoá.

Cho tới năm 1999, Kathy F và cộng sự thuộc viện khoa học thú y và vi sinh vật học, Đại học Arizona, Hoa Kỳ đã dùng phương pháp lai insitu đã đọc trình tự genom của YHV. Trong nghiên cứu này các tác giả đã nhân nhanh YHV trên vật chủ, sau đó tách chúng ra khỏi vật chủ bằng cách sàng lọc virus. Kế đến là tách chiết RNA của virus bằng Trizol LS và tổng hợp và nhân đoạn cADN đặc hiệu của YHV gồm 273 bp bằng RT – PCR. Kết quả là người ta đã đọc được trình tự đoạn gen đặc hiệu của YHV tại khu vực Thái Lan.

YHV là virus RNA gây ra bệnh đầu vàng (YHD) ở tôm thuộc họ Rhabdoviridae. Có hệ genom là RNA mạch đơn thẳng, mã hoá cho 4 chuỗi polypeptides (170, 135, 67, 22 kDa). Có vỏ ngoài bao bọc, capsid có kiểu đối xứng xoắn. Virus này có hình trứng, dài khoảng 170nm, đường kính là 45x58nm.

Phân tích sự biểu hiện gen bằng cách sử dụng real time PCR chứa SYBR green là phương pháp mới có độ nhạy hiệu quả nhất để dò và định lượng sự sao chép mRNA

*Từ khoá:* YHV; SYBR green RT-PCR; Real time –PCR; Virus tôm

### 1. Mở đầu

Vào đầu năm 1990, 60% tổng số tôm nuôi ở Thái Lan bị chết do một bệnh mới xuất hiện. Dấu hiệu lâm sàng của tôm bị bệnh là tôm bơi lơ lờ gần mặt nước, kém ăn, tôm bị chết sau 3 đến 5 ngày mắc bệnh. Khi chết toàn bộ cơ thể tôm tái nhợt, phần mang và dọc sống

lưng có màu vàng nhạt. Vì thế người ta đặt tên cho bệnh này là bệnh đầu vàng (YHD - yellow head disease). Virus YHV có hình dạng bacillus có vỏ, kích thước 150-170x40-50nm. Bộ gen virus chứa sợi đơn RNA và mã cho 4 tiểu phần protein cấu trúc 170, 135, 67, 22kDa. Các công trình nghiên cứu về YHV đã được triển khai với những phương pháp thông thường như hình thái bệnh học, mô bệnh học, dotblot, lai insitu, hoá miễn dịch tế bào và PCR. Mặc dù phương pháp PCR có độ nhạy nhất trong số các phương pháp nhưng lại không dò được các sao chép đơn của bộ gen virus trong tôm nhiễm bệnh.

Trong RT-PCR phổ huỳnh quang với chất nhuộm SYBR green đã kiểm tra được tại đầu cuối của mỗi vòng PCR. Như vậy cho phép dò sản phẩm trong pha kéo dài chuỗi của sự nhân lên. Trong hệ ABI Prism 7000 huỳnh quang của SYBR green có ái lực phụ thuộc vào nồng độ khuôn ban đầu

## 2. Vật liệu và phương pháp

### *Nguyên liệu*

- Tôm nhận được từ Trung tâm Nghiên cứu nuôi trồng tôm nước mặn Cát Bà, Hải Phòng. Trung tâm CSIRO, Australia

### *Phương pháp*

- Tách chiết RNA: Sử dụng phương pháp Trizol để tách RNA tổng số của tôm sú nghi nhiễm bệnh và mẫu tôm khoẻ.

- Tạo cDNA từ RNA tổng số bằng RT-PCR: Chu trình chạy: 42<sup>o</sup>C trong 30 phút, 94<sup>o</sup>C trong 2 phút/94<sup>o</sup>C trong 15 giây, 60<sup>o</sup> C trong 30 giây, 72<sup>o</sup>C trong 1 phút (lặp lại 35 chu kỳ)/72<sup>o</sup>C trong 7 phút, giữ ở 4<sup>o</sup>C đến khi phân tích.

- Phát hiện YHV bằng SYBR Green realtime – PCR:

+ Sử dụng cặp mồi: YHVF và YHVR có trình tự như sau:

YHVF: 5'CGTCCCGGCAATTGTGAT3'

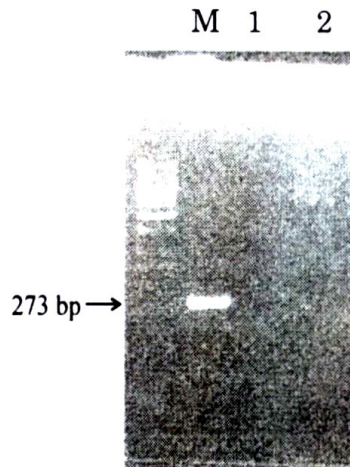
YHVR: 5'CCAGTGACGTTTCGATGCAATA3'

Để khuếch đại một đoạn gen gồm 65 bp từ đoạn 273 bp của YHV để phát hiện YHV và định lượng số bản sao ban đầu bằng chất màu huỳnh quang SYBR Green.

+ Chu trình chạy SYBR Green realtime – PCR bao gồm các bước: Hoạt hoá AmpliTaq Gold DNA Polymerase trong 10 phút, biến tính trong chu kỳ ở 95<sup>o</sup>C trong 15 giây, gắn mồi và khuếch đại nhờ AmpliTaq Gold DNA Polymerase ở 60<sup>o</sup>C trong 1 phút (lặp lại 40 chu kỳ), bước cuối cùng: Xác định Tm nhờ đường cong phân ly bằng cách tăng nhiệt độ chậm từ 60<sup>o</sup>C – 95<sup>o</sup>C trong 20 phút đồng thời đo sự thay đổi của mức độ phát huỳnh quang của SYBR Green.

## 3. Kết quả và thảo luận

### *Xác định virut YHV bằng phương pháp RT-PCR*



**Hình 1.** Kết quả xác định virus YHV bằng phương pháp RT-PCR

Kênh M: Thang DNA chuẩn 1kb.

Kênh 1: Mẫu tôm bị bệnh

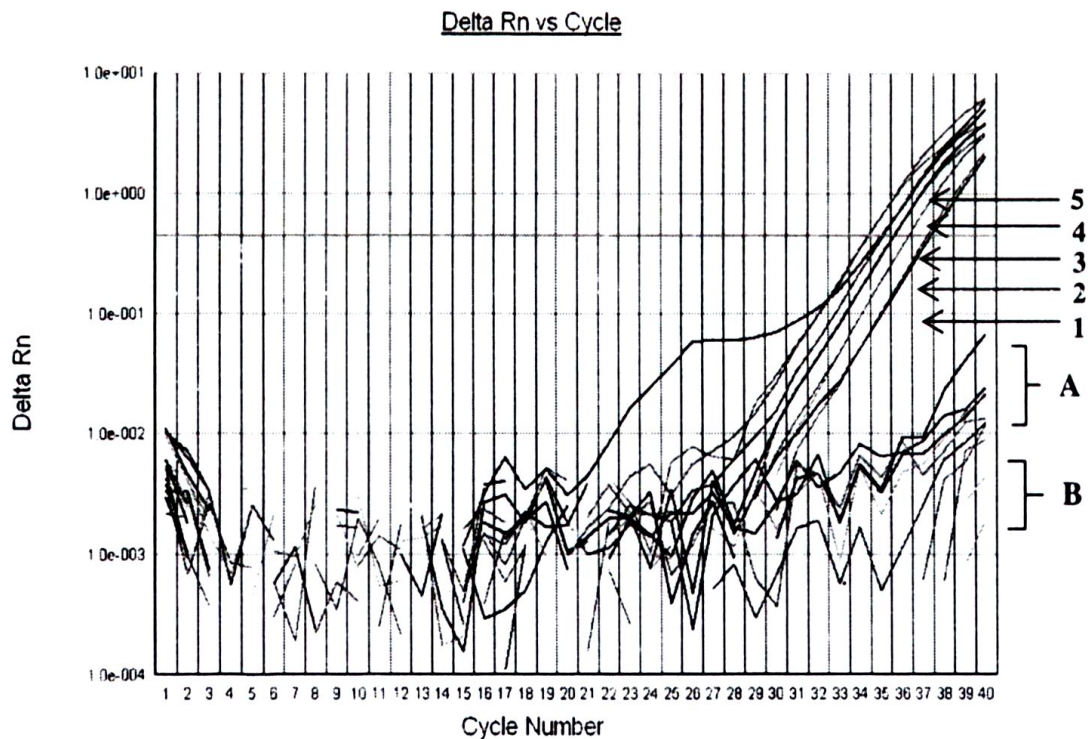
Kênh 2: Mẫu chứng âm

Bằng kỹ thuật RT-PCR kết quả điện di cho sản phẩm 273 bp

### **Xác định YHV của tôm bằng SYBR Green realtime - PCR**

Sử dụng cDNA làm khuôn với hàm lượng thay đổi (1ng, 2ng, 4ng, 6ng, 10ng đối với mẫu bệnh, và 5ng, 10ng đối với mẫu không bệnh), lặp lại 2 – 3 lần riêng rẽ cho SYBR Green realtime – PCR, nồng độ tối ưu được chọn cho cả mỗi xuôi và mỗi ngược là 300nM cho mỗi 25 $\mu$ l phản ứng để nhân bản trình tự 65bp từ sản phẩm PCR gồm 273bp ban đầu.

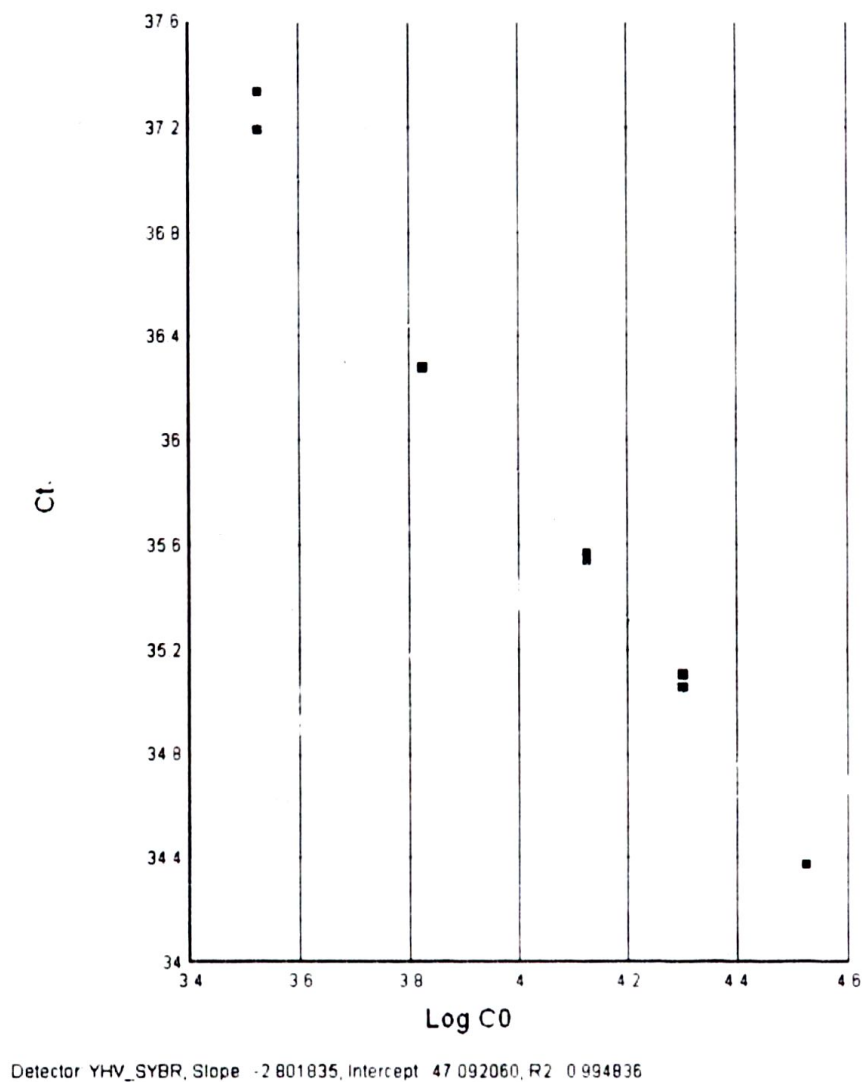
Độ nhạy và tính đặc hiệu của realtime – PCR với chất màu huỳnh quang SYBR Green sử dụng trong phát hiện YHV thể hiện ở hình 2.



**Hình 2:** Sơ đồ huỳnh quang biểu thị sự khuếch đại của sản phẩm PCR qua mỗi chu kỳ phát hiện nhờ SYBR Green. 1, 2, 3, 4, 5: tương ứng với 1ng ( $3343 \times 10^6$  bản sao), 2ng ( $6686 \times 10^6$  bản sao), 4ng ( $13372 \times 10^6$  bản sao), 6ng ( $20058 \times 10^6$  bản sao), 10ng ( $33430 \times 10^6$  bản sao) cDNA được sử dụng làm khuôn, A: Các mẫu đối chứng âm tính, B: Các mẫu đối chứng không bổ sung DNA

Kết quả trên cho thấy chỉ ở các mẫu dương tính giá trị Delta Rn (biểu thị giá trị huỳnh quang thu được sau khi trừ đi tín hiệu nền của mẫu đối chứng không bổ sung DNA) tăng lên rất nhanh bắt đầu từ chu kỳ 28 và có sự khác biệt rất rõ giữa các mẫu có nồng độ cDNA ban đầu khác nhau.

$T = 0.447$  được chọn để dựng đường chuẩn biểu thị hiệu quả khuếch đại trên đồ thị (hình 3) với trục tung: Ct. Giá trị ngưỡng của chu kỳ (Cycle threshold) phản ánh số chu kỳ cần thiết để huỳnh quang tạo thành vượt giá trị T, trục hoành: Log C0 là giá trị logarit của số lượng copy ban đầu.



**Hình 3:** Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa Ct và Log C0

Hệ số tương quan bình phương thu được rất cao ( $r^2 = 0.994836$ ) chứng tỏ mối tương quan giữa LogC0 (trục X) và Ct (trục Y) rất chặt và tuân theo phương trình:  $y = -2.8018(\log X) + 47.092$ . Giá trị Ct trung bình của các lần lặp lại dao động từ  $34.37 \pm 0.00$  ( $33430 \times 10^6$  bản sao) đến  $37.34 \pm 0.105$  ( $3343 \times 10^6$  bản sao) chứng tỏ mẫu có số lượng bản sao ban đầu cao vượt giá trị ngưỡng T(threshold) ở những chu kỳ sớm hơn so với các mẫu có số lượng bản sao

ban đầu thấp do sự tích lũy nhanh chóng hơn của sản phẩm đặc hiệu (Hình 3, Bảng 1). Hai mẫu âm tính và dương tính lặp lại hai lần (S1.1, S1.2) và (S2.1, S2.2) được chọn để xác định số bản sao ban đầu. Kết quả cho thấy ở mẫu dương tính số bản sao được xác định là  $35726.22 \times 10^6$ , mẫu âm tính không xác định được (bảng 1).

**Bảng 1:** Kết quả định lượng cDNA của YHV

Tên mẫu	Hàm lượng(ng)	Dạng mẫu	Ct	SD	Số copy( $\times 10^6$ )
1.1	1	Tiêu chuẩn	37.34	0.105	3343
1.2	1	Tiêu chuẩn	37.19	0.105	3343
2.1	2	Tiêu chuẩn	36.28	0.002	6686
2.2	2	Tiêu chuẩn	36.28	0.002	6686
3.1	4	Tiêu chuẩn	35.54	0.021	13372
3.2	4	Tiêu chuẩn	35.57	0.021	13372
4.1	6	Tiêu chuẩn	35.06	0.033	20058
4.2	6	Tiêu chuẩn	35.11	0.033	20058
5.1	10	Tiêu chuẩn	34.37	0	33430
5.2	10	Tiêu chuẩn	34.37	0	33430
S1.1		Âm tính			
S1.2		Âm tính			
S2.1		Dương tính	34.34	0	35726.22
S2.2		Dương tính	34.34	0	35726.22

Kỹ thuật Realtime – PCR với SYBR Green còn cho phép phân tích được sự xuất hiện của sản phẩm đặc hiệu, không đặc hiệu cũng như ảnh hưởng nhiễu của hiện tượng môi tự bất cặp qua đường cong phân ly (hình 4). Kết quả thu được trên hình 3 xuất hiện một đỉnh duy nhất có  $T_m = 78,5^{\circ}\text{C}$ , là giá trị  $T_m$  của sản phẩm đặc hiệu 65bp và chỉ xuất hiện ở mẫu dương tính và các mẫu được chọn để dựng đường chuẩn khẳng định độ chính xác đáng tin cậy của các số liệu thu được. Một cách tương tự arun K. Dhar và cs thu được  $T_m = 79,2^{\circ}\text{C}$ , khác biệt này có thể do ảnh hưởng của nhiều nhân tố trong đó có thành phần muối trong mẫu được sử dụng làm khuôn.

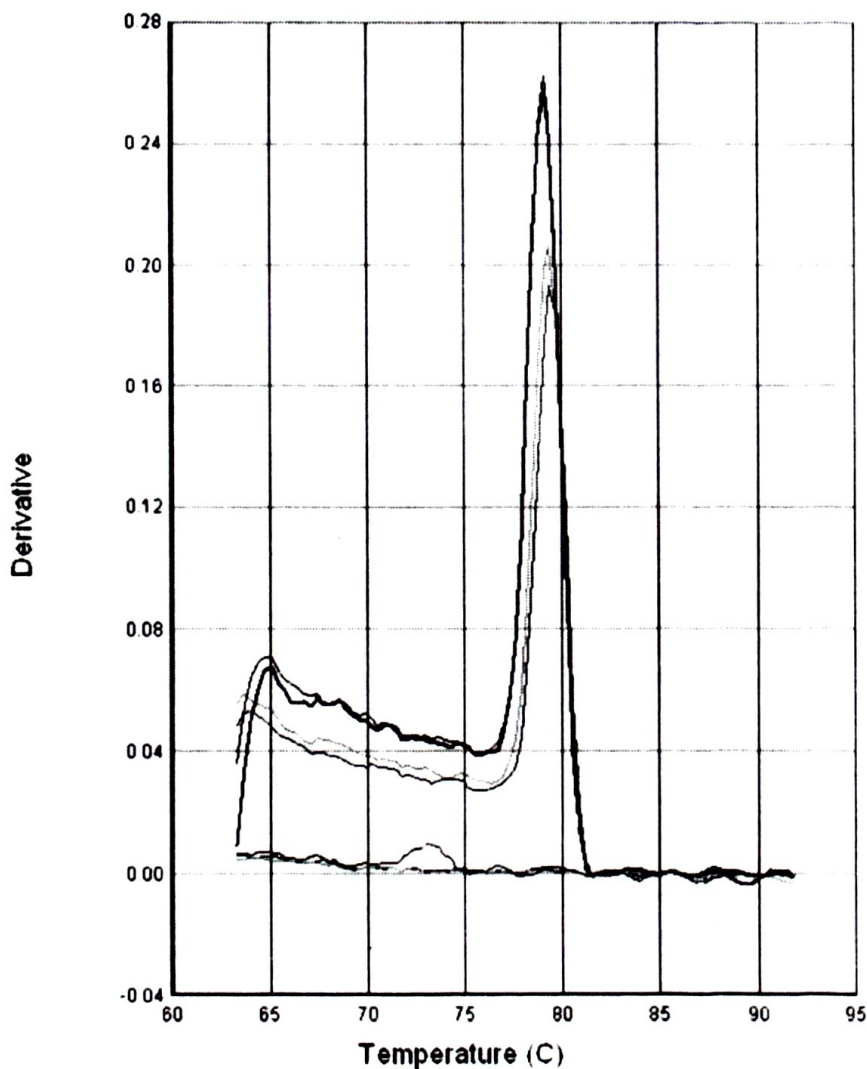
#### 4. Kết luận

Trong SYBR Green với 40 chu kỳ để dò sao chép đơn của bộ gen virus.

Tại giá trị của  $Ct=28$ , chúng ta có thể quan sát được sự tăng lên của số bản copy.

Như vậy, SYBR Green RT-PCR không chỉ cho độ nhạy cao mà còn rất đặc hiệu để kiểm tra độ phóng đại và đường cong phân ly. Sử dụng Real time RT-PCR với SYBR Green cho kết quả rất nhanh, mất khoảng 2 giờ chạy với 96 giếng. Sau khi chạy xong máy phân tích kết quả chỉ mất vài phút.

Tóm lại, phương pháp SYBR Green RT-PCR mô tả trên rất có lợi cho việc dò và định lượng YHV trong tôm. Phương pháp này nhanh, độ nhạy cao và áp dụng với số mẫu lớn để chẩn đoán nghiên cứu di truyền trong tôm nuôi.



Hình 4: Đường cong phân ly của mô nhiễm YHV

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Wongteerasupaya C., Sriurairatana S., Vickers J.E., Anutara A., Boosaeng V., Panyim S., Tassanakajon A., Withyachumnarnkul B., Flegel TW, Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Dis. Aquat. Org* **22**(1995), 45-50.
2. Dhar A.K., Roux M.M., Klimpel K.R., Quantitative assay for measuring the Taura syndrome virus (TSV) and yellow head virus (YHV) load in shrimp by real time RT-PCR using SYBR Green chemistry. *J. Virol. Methods* **104**(2002), 69-82.
3. Mouillesseaux K.P., Klimpel K.R., Arun K., Dhar A.K., Improvement in the specificity and sensitivity of detection for the Taura syndrome virus and yellow head virus of penaeid shrimp by increasing the amplicon size in SYBR Green real time RT-PCR. *J. Virol. Methods* **111**(2003), 121-127.
4. Công trình có sự hỗ trợ của chương trình NCCB trong KHTN

## USING SYBR GREEN REAL- TIME RT-PCR TO DETECTION AND QUANTITY YELLOW HEAD VIRUS LOAD IN SHRIMP

Vu Thị Ngọc Bích, Nguyen Kim Do, Trinh Quy Bon, Bach Nhu Quynh,  
Dinh Duy Khang, Dinh Thuong Van

*Institute of Biotechnology, Vietnamese Academy of Science & Technology*

Yellow head disease has caused extensive losses to shrimp farmers in the eastern and central parts of the country. Virus particles observed in necrotic tissues of gills and lymphoid organ were bacilliform in shape, ranging from 150-200nm in length and 40-50 nm in diameter and were enveloped singly by trilaminar unit membrane. The yellow head virus particle possesses a bacilliform morphology. It consists of two structural unit, nucleocapsid and envelope. Affected shrimp have a pale body and light yellow coloration of the hepatopancreas and gills. The number of affected shrimp was increase up to 50-60% of total population and cumulative mortalities often reach 100% of affected population within 3-5 days from the onset of the disease both in the culture system and experimental trial

We have used real time RT-PCR technique with SYBR green for detectible and quantitative assay Yellow head virus (YHV) in Shrimp. Yellow head virus is RNA virus infecting penaeid shrimp (*Penaeus* sp.). This virus caused major economic losses to shrimp aquaculture. A rapid and highly sensitive detection and quantification method for YHV was developed using ABI Prism 7000 detection system with SYBR green chemistry, which binds to double stranded DNA (ds DNA). We found the Ct=28 and the equation  $y = -2.8018(\log X) + 47.092$  for standard curve. This method is very useful for diagnostic, epidemiological and genetic studied in shrimp aquaculture

**Key words:** SYBR green RT-PCR; Yellowhead virus; Shrimp virus