

Nghiên cứu xác định một số loài đồng hình thuộc phức hợp muỗi *Anopheles maculatus* ở xã Phước Chiến, huyện Thuận Bắc, tỉnh Ninh Thuận bằng kỹ thuật PCR - RFLP

Bùi Minh Hồng^{1,*}, Đỗ Mạnh Cường², Trần Thị Thu Trang¹, Nguyễn Đức Hùng¹

¹Đại học Sư phạm Hà Nội, 136 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

²Viện vệ sinh phòng dịch Quân đội, 21 Trung Liệt, Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 03 tháng 3 năm 2014

Chỉnh sửa ngày 18 tháng 8 năm 2014; Chấp nhận đăng ngày 17 tháng 11 năm 2014

Tóm tắt. Ở Việt Nam, trước đây muỗi *An. maculatus* được xác định là một loài đơn, phân bố rộng rãi ở vùng rừng núi trên toàn quốc. Những nghiên cứu gần đây về hình thái, tế bào cho thấy phức hợp loài này gồm ít nhất 8 loài đã được định tên (*An. maculatus*, *An. pseudowillmori*, *An. notanandai*, *An. sawadwongporni*, *An. willmori*, *An. dradivicus*, *An. dispar* và *An. greeni*) và một số dạng chưa xác định rõ vị trí phân loại. Để phân loại một số loài đồng hình phức hợp muỗi *Anopheles maculatus* bằng các đặc điểm hình thái rất khó xác định chúng.

Nghiên cứu xác định các loài đồng hình trong phức hợp muỗi *An. maculatus* bằng các enzym giới hạn trong phân tích DNA nhằm đưa ra chính xác tên từng loài muỗi trong phức hợp muỗi *An. maculatus* là một trong những hướng quan trọng trong phân loại học các loài đồng hình.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng các enzym giới hạn (HSP92II, TruI, AluI, Sau3AI và DdeI) để phân tích đoạn DNA ITS2 của các loài đồng hình muỗi *An. maculatus*. Kết quả cho thấy enzym giới hạn HSP92II, TruI, AluI có thể sử dụng để phân tích DNA của 2 loài *Anopheles sawadwongporni* và *Anopheles maculatus* trên sản phẩm PCR đoạn gene ITS2 còn enzym Sau3AI và DdeI không thể sử dụng để phân tích 2 loài.

Từ khóa: Loài đồng hình muỗi, enzym giới hạn HSP92II, TruI, AluI, Sau3AI và DdeI.

1. Mở đầu

Ninh Thuận là một tỉnh thuộc duyên hải miền Trung, tình hình sốt rét của người dân chưa ổn định, mỗi năm số người mắc bệnh sốt rét và tử vong do sốt rét tăng. Trong các điểm nóng sốt rét của tỉnh có xã Phước Chiến huyện Thuận Bắc gồm cộng đồng dân cư chủ yếu là người Raglai, có tập quán lên nương, làm rẫy và ngủ lại tại nương rẫy trên núi. Khu vực

nương rẫy trên núi là rừng thứ sinh tiếp giáp với rừng nguyên sinh ít bị tác động là nơi sống lý tưởng của loài *Anopheles maculatus*. Vì vậy việc đi sâu nghiên cứu một cách đầy đủ phức hợp muỗi *An. maculatus* tại đây là một vấn đề rất đáng quan tâm hiện nay [1].

Những nghiên cứu về côn trùng gây bệnh, trong đó có muỗi *Anopheles*, trung gian truyền bệnh sốt rét ngày càng được đẩy mạnh trên mọi phương diện: phân loại, phân bố, vai trò truyền bệnh, sinh học, tập tính và biện pháp phòng chống. Nhiều phương pháp kỹ thuật, nghiên

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-904314869.
Email: bui_minhhong@yahoo.com

cứ mới nhằm phân loại và xác định nguồn gốc phát sinh được ứng dụng rất mạnh. Việc kết hợp giữa các phương pháp nghiên cứu truyền thống với những phương pháp sinh học phân tử là rất cần thiết để nghiên cứu quần thể muỗi truyền bệnh. Nhiều loài muỗi lúc đầu được xác định như một loài đơn, nhưng trong quá trình nghiên cứu về vai trò dịch tễ, đặc điểm sinh học và sử dụng các kỹ thuật mới, áp dụng các chỉ thị phân tử (chỉ thị DNA), hóa sinh... đã xác định chúng là những nhóm đồng hình, và có những vai trò truyền bệnh khác nhau [2,3].

Loài *Anopheles maculatus* được Theobald phát hiện ở Hồng Kông, Trung Quốc vào năm 1901. Đây là loài muỗi phân bố rộng rãi ở vùng Ấn Độ, Đài Loan... Cho đến nay, phức hợp *An. maculatus* gồm ít nhất 12 loài thành viên. Nhiều thành viên trong nhóm này đã được xác định có vai trò truyền bệnh ở Malaysia, Thái Lan, Nepal, Trung Quốc, Singapore.

Ở Việt Nam, trước đây, muỗi *An. maculatus* được xác định là một loài đơn, phân bố rộng rãi ở vùng rừng núi trên toàn quốc. Những nghiên cứu gần đây về hình thái, tế bào cho thấy phức hợp loài này gồm ít nhất 8 loài đã được định tên (*An. maculatus*, *An. pseudowillmori*, *An. notanandai*, *An. sawadwongporni*, *An. willmori*, *An. dradivicus*, *An. dispar* và *An. greeni*) và một số dạng chưa xác định rõ vị trí phân loại. Đến nay loài *An. maculatus* vẫn được coi là vector truyền bệnh thứ yếu ở nước ta. Nhiều vấn đề mang tính hệ thống liên quan đến phân loại, vai trò truyền bệnh... của loài muỗi này ở Việt Nam cần được giải quyết. Phức hợp loài này lại là vector chính truyền bệnh sốt rét tại vùng rừng núi miền Bắc Thái Lan [4]. Bài báo này cung cấp một số dẫn liệu về enzyme giới hạn để phân tách DNA của các loài thuộc phức hợp muỗi *An. maculatus* sibling species thu thập được ở làng Tập Lá huyện Phước Chiển, tỉnh Ninh Thuận để xác định được tên loài.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương pháp thu thập và xử lý mẫu tại địa điểm nghiên cứu

Muỗi *Anopheles* được thu thập tại địa điểm nghiên cứu bằng bẫy đèn CDC (Control Disease Center) của Tổ chức Y tế Thế giới WHO tại xã Phước Chiển, huyện Thuận Bắc, tỉnh Ninh Thuận.

Bẫy đèn hoạt động bằng 6 pin, mô tơ và đèn có thời gian hoạt động liên tục từ 18 giờ ngày hôm trước đến 6 giờ sáng ngày hôm sau. Bẫy đèn được đặt xung quanh gia súc và gần nhà dân.

Muỗi sau khi thu thập và định loại bằng hình thái được lưu trữ trong tuýp đựng mẫu, ghi đầy đủ thông tin của mẫu. Bảo quản các tuýp đựng mẫu trong lọ có các hạt hút ẩm silicagel và chuyển về phòng thí nghiệm. Thời gian thu thập muỗi tại xã Phước Chiển, huyện Thuận Bắc, tỉnh Ninh Thuận được tiến hành qua 2 đợt:

+ Đợt 1: từ ngày 20/6/2012 đến ngày 30/6/2012

+ Đợt 2: từ ngày 15/11/2012 đến ngày 22/11/2012.

2.2. Phân tích loài đồng hình bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction (PCR)

Tách DNA nhân tế bào tiêu bản muỗi *Anopheles* và phân tích genome type bằng phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction) và cắt mảnh sản phẩm PCR bằng enzym giới hạn.

3. Kết quả và thảo luận

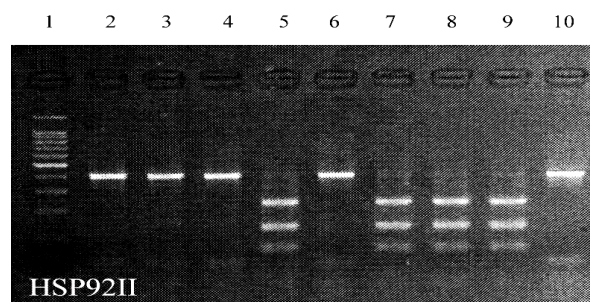
3.1. Kết quả phân tích trình tự ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2) so sánh với trình tự công bố trên ngân hàng gene thế giới

Mẫu sau khi tách DNA, chạy PCR tại Viện Vệ sinh Phòng dịch Quân đội được gửi sang Viện nghiên cứu Sốt rét lục quân Australia giải

trình tự và so sánh với ngân hàng gene quốc tế. Kết quả phân tích trình tự gen cho thấy có 2 loài muỗi *An. maculatus* và *An. sawadwongporni* xuất hiện ở địa điểm nghiên cứu. Trong tổng số 530 mẫu thu được đem phân tích, có 305 mẫu thuộc loài *An. sawadwongporni* và 225 mẫu thuộc loài *An. maculatus*.

Kết quả phân tích gene tương ứng với phân bố của 2 loài: *An. sawadwongporni* chỉ ghi nhận ở 2 điểm là thôn Đầu Suối và thôn Tập Lá. Loài *An. maculatus* chỉ thu bắt được tại thôn Ma Trai và Đồng Thông. Trong đó tại Phước Chiến, tồn tại hai sinh cảnh: hai thôn Tập Lá và Đầu Suối có sinh cảnh ở gần rừng, trong khi hai thôn Đồng Thông và Ma Trai xa rừng hơn. Có thể sự phân tách địa lý và sinh thái này đã dẫn tới sự phân tách kiểu gene dẫn đến sự phân tách của 2 loài trong cùng xã Phước Chiến. Hoặc cũng có thể loài *An. sawadwongporni* chỉ thích nghi với sinh cảnh gần rừng, trong khi loài *An. maculatus* chỉ có thể tồn tại ở khu vực dân cư, xa rừng.

3.2. Kết quả phân cắt sản phẩm PCR bằng enzym HSP92II

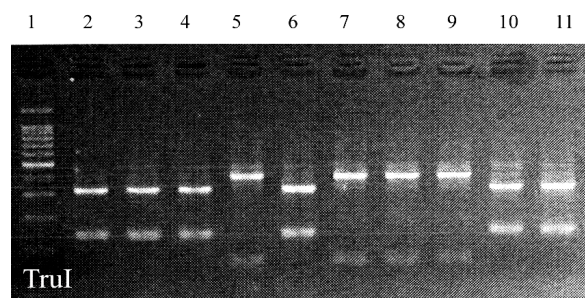


Hình 1. Sản phẩm điện di của PCR sau khi cắt bằng enzym giới hạn HSP92II.

Từ hình 1, ta thấy, giếng số 1 là thang chuẩn, vạch đậm nhất tương ứng với kích thước 500bp. Giếng số 2, 3, 4, 6 và 10 là kết quả phân cắt sản phẩm PCR của muỗi *An. maculatus*. Còn giếng số 5, 7, 8, 9 là kết quả phân cắt sản phẩm PCR của muỗi *An. sawadwongporni*.

Kết quả điện di cho thấy sản phẩm PCR từ DNA của loài *An. sawadwongporni* bị phân cắt thành 2 đoạn có kích thước tương ứng 150 bp và 250 bp trong khi sản phẩm PCR từ DNA của loài *An. maculatus* gần như không bị phân cắt và thể hiện bởi 1 đoạn có kích thước lớn hơn (khoảng 400 bp).

3.3. Kết quả phân cắt sản phẩm PCR bằng enzym TruI



Hình 2. Sản phẩm điện di của PCR sau khi cắt bằng enzym giới hạn TruI.

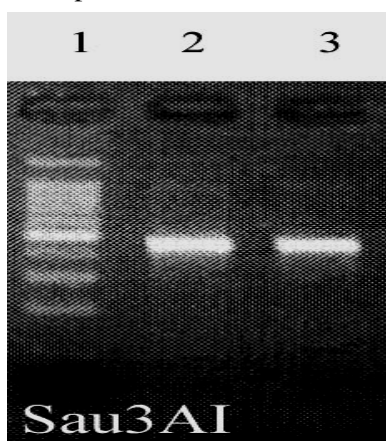
Từ hình 2, ta thấy, giếng số 1 là thang chuẩn, vạch đậm nhất tương ứng với kích thước 500bp. Giếng số 2, 3, 4, 6, 10 và 11 là kết quả phân cắt sản phẩm PCR của muỗi *An. maculatus*. Còn giếng số 5, 7, 8, 9 là kết quả phân cắt sản phẩm PCR của muỗi *An. sawadwongporni*.

Kết quả điện di cho thấy sản phẩm PCR từ DNA của loài *An. sawadwongporni* bị phân cắt ít, biểu hiện bởi đoạn có kích thước khoảng 400 bp, trong khi sản phẩm PCR từ DNA của loài *An. maculatus* bị phân cắt nhiều hơn và biểu hiện bởi đoạn có kích thước khoảng 300 bp.

3.4. Kết quả phân cắt sản phẩm PCR bằng enzym Sau3AI

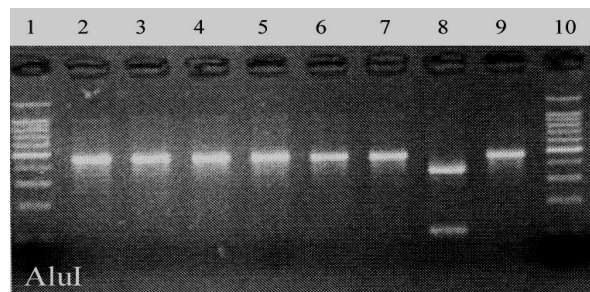
Từ hình 3, ta thấy, giếng số 1 là thang chuẩn, vạch đậm nhất tương ứng với kích thước 500bp. Giếng số 2 và số 3 gồm các đoạn có kích thước giống nhau và không bị phân cắt.

Kết quả điện di cho thấy, sản phẩm PCR từ DNA của loài *An. sawadwongporni* và *An. maculatus* không thể tách biệt bằng enzym Sau3AI. Kết quả điện di sau khi ủ enzym của 2 loài đều cho băng DNA giống nhau, kích thước khoảng 500 bp.



Hình 3. Sản phẩm điện di của PCR sau khi cắt bằng enzym giới hạn Sau3AI.

3.5. Kết quả phân cắt sản phẩm PCR bằng enzym AluI

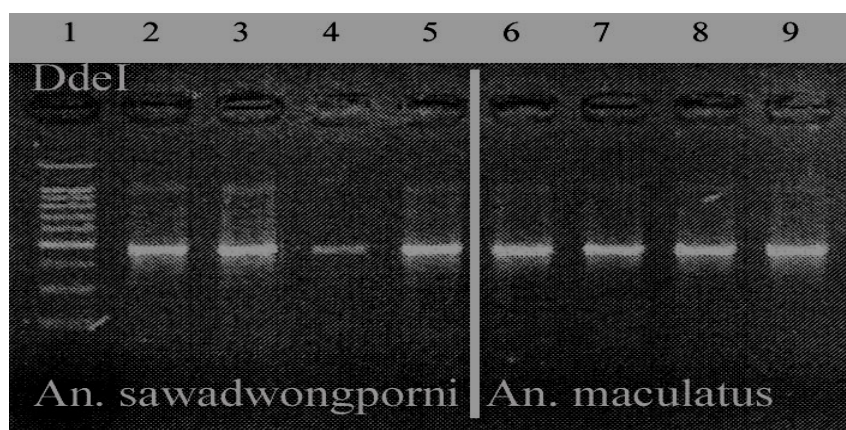


Hình 4. Sản phẩm điện di của PCR sau khi cắt bằng enzym giới hạn AluI.

Từ hình 4, ta thấy, giếng số 1 là thang chuẩn, vạch đậm nhất tương ứng với kích thước 500bp. Giếng số 2, 3, 4, 5, 6, 7 và 9 là kết quả phân cắt sản phẩm PCR từ DNA của muỗi *An. maculatus*. Còn giếng số 8 là kết quả phân cắt sản phẩm PCR từ DNA của muỗi *An. sawadwongporni*

Hai loài thuộc phức hợp loài *An. maculatus* sl. có thể phân biệt bằng enzyme giới hạn AluI, loài *An. sawadwongporni* thể hiện với băng có kích thước nhỏ (400 bp) trong khi loài *An. maculatus* đặc trưng bởi băng DNA có kích thước 500 bp.

3.6. Kết quả phân cắt sản phẩm PCR bằng enzym DdeI



Hình 5. Sản phẩm điện di của PCR sau khi cắt bằng enzym giới hạn DdeI.

Từ hình 5, ta thấy, giếng số 1 là thang chuẩn, vạch đậm nhất tương ứng với kích thước 500bp. Giếng số 6, 7, 8, 9 là kết quả phân cắt sản phẩm PCR của muỗi *An. maculatus*. Còn giếng số 2, 3, 4, 5 là kết quả phân cắt sản phẩm PCR của muỗi *An. sawadwongporni*.

Enzym DdeI không thể dùng để phân tách 2 loài *An. maculatus* và *An. sawadwongporni*, sản phẩm sau khi ủ enzym đều cho ra băng với kích thước khoảng 500 bp.

4. Kết luận

4.1. Đã xác định được trong khu vực xã Phước Chiến, huyện Thuận Bắc, tỉnh Ninh Thuận có 2 loài muỗi thuộc phức hệ *Anopheles maculatus* sl. đó là *An. sawadwongporni* và *An. maculatus*.

4.2. Nghiên cứu đã chỉ ra các chỉ thị ở cấp độ sinh học phân tử khi sử dụng enzym giới hạn để phân biệt DNA của 2 loài *An. sawadwongporni* và *An. maculatus* trên sản phẩm PCR đoạn gene ITS2 là các enzym: HSP92II, TruI, AluI. Còn 2 enzym Sau3AI và DdeI không thể sử dụng để phân tách chúng.

Tài liệu tham khảo

- [1] Erhart A, Thang. N.D, Hung .N.Q, Toi .L.V, Hung. L.X, Tuy T.Q, Cong L.D, Speybroeck N, Coosemans M, D'alessandro U. Forest malaria in Vietnam: a challenge for control. Am J Trop Med Hyg (2004), 70:110-118.
- [2] Lê Khánh Thuận. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của *Anopheles minimus* và *Anopheles dirus* các yếu tố thời tiết, nhiệt độ, độ ẩm, lượng mưa liên quan đến lan truyền sốt rét ở điểm nghiên cứu Vân Canh, Bình Định và Lakor, Chư Sê, Gia Lai. Kỹ yếu công trình nghiên cứu khoa học 1996 – 2000, Bộ Y tế, Viện Sốt rét, Ký sinh trùng, Côn trùng Trung Ương, (2000) tr. 422-433.
- [3] Do Manh Cuong, Nguyen Thi Hong Van, Le Quang Tao, Tran Lien Chau, Le Ngoc Anh, Nguyen Xuan Thanh, Cooper R.D. Identification of *Anopheles minimus* complex and related species in Vietnam. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health (2008). 39(5):827-31.
- [4] Do Manh Cuong, Beebe. N.W, Nguyen Thi Hong Van, Le Quang Tao, Tran Lien Chau, Dung Nguyen Van, Nguyen Xuan Thanh, Anh Le Nguyen, Cooper R.D. Vectors and malaria transmission in deforested, rural communities in North-central Vietnam. Malaria J.(2010). 9: 259.

Study on Identification of Sibling *Anopheles maculatus* Species in Phước Chiến Commune, Thuận Bắc District, Ninh Thuận Province by Using PCR- RFLP Technique

Bùi Minh Hồng¹, Đỗ Mạnh Cường², Trần Thị Thu Trang¹, Nguyễn Đức Hùng¹

¹Faculty of Biology, Hanoi National University of Education, Vietnam,
136 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hanoi, Vietnam

²Military Institute of Hygiene and Epidemiology, 21 Trung Liệt, Đống Đa, Hanoi, Vietnam

Abstract. In Vietnam, previously, *An. maculatus* mosquito was identified as a single species widely distributed in forested areas across the country. Recent studies on morphology and cellular biology have shown that the complex of this species includes at least eight species which have been named (*An. maculatus*, *An. pseudowillmori*, *An. notanandai*, *An. sawadwongporni*, *An. willmori*, *An.*

dradivicus, *an. dispar* and *An. greeni*) and several species types which have not been classified. It is very hard to use morphological characters for identifying sibling species in *An. maculates* group.

Restriction enzymes have been used for RFLP analysis in which DNA fragments are molecular markers. Thus, using restriction enzymes is an important method to identify individual species in the group of sibling species *An. maculates*.

Restricted enzymes: HSP92II, TruI, AluI, Sau3AI and DdeI were used for cutting ITS2 sequence of *An. maculatus* sl. The result showed that HSP92II, TruI, AluI can be used to discriminate between *Anopheles sawadwongporni* and *Anopheles maculatus* species. But Sau3AI and DdeI can not use for identification of two members that found from Phuoc Chien District, Ninh Thuan Province.

Keywords: Sibling species, restricted enzymes HSP92II, TruI, AluI, Sau3AI and DdeI.