25(4): 42-46 Tạp chí SINH HỌC 12-2003

PHÁT HIỆN CÁC GIEN MÃ HÓA HEMOLYSIN BỀN NHIỆT VÀ KHÔNG BỀN NHIỆT CỦA *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* BẰNG PHƯƠNG PHÁP PCR

NGUYỄN HOÀNG UYÊN, NGUYỄN CHÍ THUẬN, NGUYỄN THỊ THANH LỢI, NGUYỄN THỊ HỒNG HẠNH

Viện Công nghệ sinh học

Vibrio parahaemolyticus là vi khuẩn gram âm khu trú trong môi trường tự nhiên ven biển. Vi khuẩn này có khả năng gây thành dịch bệnh với nhiều đối tượng hải sản nuôi như tôm, cua, hầu, ,.. Một số chủng có khả năng gây bệnh ở người [2]. Phương pháp phân loại vi sinh vật dựa theo đặc điểm sinh lý và chỉ tiêu sinh hóa, có thể dễ dàng phát hiện *V. parahaemolyticus*, nhưng không phân biệt được các chủng mang các gien gây bệnh. Kết quả nghiên cứu bộ gien của *V. parahaemolyticus* đã xác định được gien mã hóa hemolysin không bền nhiệt (*tlh*) mã hóa protein TLH và là gien đặc hiệu loài [8], gien mã hóa hemolysin bền nhiệt (*tdh*) mã hóa protein TDH liên quan đến nguồn gốc gây các bệnh nhiễm khuẩn, viêm loét dạ dày của người [1]. Việc ứng dụng phương pháp PCR để xác định các gien *tlh* và *tdh* của các chủng *V. parahaemolyticus* cho phép nhận diện các chủng mang gien gây bệnh.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Mẫu vi khuẩn *Vibrio* spp. được phân lập từ tôm sú thu ở các đầm nuôi bị bệnh (Nam Định, Hải Phòng, Thanh Hóa) có dấu hiệu bệnh lý tôm sú rõ ràng (vỏ mềm, thân biến màu đỏ, vàng...,), có trọng lượng trung bình 10-25 g, trong thời gian từ tháng 6-8 năm 2001.

2. Phương pháp

a) Phân lập vi khuẩn

Vi khuẩn được làm giàu trong môi trường lỏng pepton kiềm (APW) [10 g bactotrypton, 30g NaCl trong 1 l; pH = 8,5] ở nhiệt độ 28°C trong 8-16 giờ. Phân lập *Vibrio* spp. trên môi trường TCBS. Định tên dựa trên các đặc điểm sinh lý sinh hóa bằng test thử API-20E.

b) Kỹ thuật PCR

ADN tổng số của vi khuẩn được tách chiết và làm sạch theo Promega [6]. Kiểm tra độ sạch trên gel agaroza 1%, đệm TAE 1X.

Cặp mồi Vp *tlh*-1 dùng để nhân gien *tlh* được thiết kế dựa trên trình tự gien (*tlh*) của *V. parahaemolyticus* No M36437 [8]: *tlh*-1: 5' - AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG - 3' ; *tlh*-2: 5'- GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC -3'. Cặp mồi Vptdh-2 dùng phát hiện gien *tdh* được thiết kế dựa trên trình tự gien *tdh* của *V. parahaemolyticus* No M10069 [4] : *tdh*-1: 5'-GCT TAC AGC TTG GTA TGC C-3'; *tdh*-2: 5'-GGA GAT AGA AGA AAC CTT CC-3'. Phản ứng PCR nhân gien với thể tích là 25 µl theo chu trình: biến tính ADN ở 95°C trong 5 phút; (50°C - 1'30; 72°C - 2 phút; 95°C - 1 phút) - 40 chu kỳ; 72°C - 10 phút, sau đó giữ ở 4°C. Multiplex PCR với sự có mặt đồng thời 2 cặp mồi Vptlh-1 và Vptdh-2, chu trình nhiệt phản ứng tương tự như chu trình nhiệt của phản ứng nhân đơn các gien *tlh* và *tdh*.

Kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agaroza 1%, đệm TAE 1X. Quan sát và chụp ảnh bằng GEL-DOC.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả phân lập và phát hiện vi khuẩn *Vibrio* spp.

Từ xoang tiêu hóa của tôm bệnh, đã phân lập được 35 chủng vi khuẩn *Vibrio* spp. trên môi

Bảng 1

Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của các chủng vi khuẩn đã phân lập

Tính chất	ATCC 17803	Vp.PMI	Vp.PM2	Vp.PM3	Vp.PM4	V.PM5	Vp.PM7	Vp.TSI	VBT
Sinh trưởng trên TCBS	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Sinh trưởng trên % NaCl									
8	+	+	+	+	+	-	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sinh trưởng tại nhiệt độ									
4°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nhuộm gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: +: dương tính, -: âm tính, X: khuẩn lạc màu xanh.

Bảng 2

Kết quả test thử sinh hóa API 20E

Phép thử	Phản ứng/enzym	ATCC 17803	Vp.PMI	Vp.PM2	Vp.PM3	Vp.PM4	V.PM5	Vp.PM7	Vp.TSI	VBT
ONPG	Beta-galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH	Aginine dihydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	Lysine decarboxydase	+	+	+	+	+	-	+	+	-
ODC	Ornithin decarboxydaza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT	Sử dụng Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H_2S	Sinh H_2S	-	-	-	-	-	-	-	-	+
URE	Ureaza	-	-	-	-	-		-	-	-
TDA	Trytophan deaminaza						+			
IND	Sinh Indon	-	-	-	-	-	+	-	-	-
VP	Sinh acetoni	-	-	-	-	-	+	-	-	-
GEL	Gelatinaza	+	+	+	+	+	-	+	+	+
GLU	Lên men oxy hoá	+	+	+	+	+	-	+	+	-
MAN	Lên men oxy hoá	+	+	+	+	+	-	+	+	-
INO	Lên men oxy hoá	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	Lên men oxy hoá	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RNA	Lên men oxy hoá	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-
MEL	Lên men oxy hoá	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMY	Lên men oxy hoá	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARA	Lên men oxy hoá	-	-	-	-	-	-	+	-	-

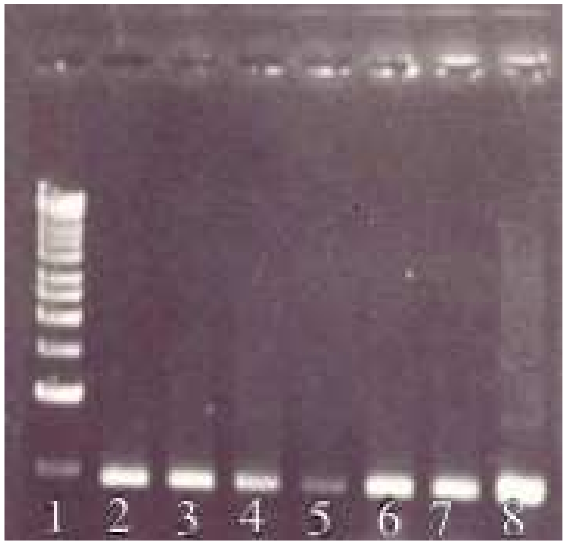
trường TCBS. Dựa theo các đặc điểm sinh lý, sinh hóa và test thử API 20E (các bảng 1, 2). đã xác định được 7 chủng thuộc loài *V. parahaemolyticus* và 28 chủng *Vibrio* spp.

2. Kết quả PCR xác định các gien *tlh* và *tdh*

PCR đoạn gien *tlh* 450 bp với cặp mồi Vp *tlh*-1 cho kết quả dương tính với 7 chủng *V. parahaemolyticus (*ATCC17803; VpPM1; VpPM2; VpPM3; VpPM4; VpTSI; VpPM7) *và* âm tính với tất cả các chủng *Vibrio* spp. khác (*V. alginolyticus, V. harveyi, V. anguillarum* và 28 chủng khác thuộc nhóm *Vibrio* spp. (bảng 2, hình 1). Như vậy, sử dụng gien *tlh* để phát hiện các chủng *V. parahaemolyticusph cho* kết quả hoàn toàn phù hợp với sử dụng test API 20E.

Kết quả PCR gien *tdh* sử dụng cặp mồi Vptdh-2 với 7 chủng *V. parahaemolyticus***,** chỉ phát hiện có chủng VpPM4 và chủng ATCC17803 cho kết quả dương tính (đường 3; hình 2). Gien *tdh* của chủng VpPM4 (đường 3; hình 2) có độ dài gần1000 bp, ngắn hơn so với gien *tdh* của chủng chuẩn ATCC17803 (đường 5; hình 2). Tuy gien *tdh* của chủng VpPM4 có độ dài ngắn hơn, nhưng cặp mồi Vptdh-2 của gien *tdh* được thiết kế dựa trên trình tự gien *tdh* của *V. parahaemolyticus* No M10069 [4] sử dụng phù hợp. Nghiên cứu của các tác giả khác {5,3} cũng tìm được các gien *tdh* với độ dài khác nhau từ 721 bp đến 1261 bp. Như vậy gien *tdh* của chủng VpPM4 có độ dài tương tự với các chủng công bố. Bằng phương pháp PCR cho phép phát hiện và phân biệt được các chủng mang gien *tdh* gây bệnh mà phương pháp phân loại vi sinh vật không xác định được.

Multiplex PCR đoạn gien *tlh* và gien *tdh* thực hiện với 2 chủng VpPM4 và ATCC17803 cho kết quả dương tính với cả hai gien (đường 4 và 7; hình 2) và hoàn toàn phù hợp với kết quả PCR riêng từng gien *tlh* và gien *tdh*. Như vậy có thể sử dụng phương pháp multiplex PCR để đồng thời phát hiện được cả hai gien *tlh* và *tdh* trên bộ genom của *V. parahaemolyticus*.



Hình 1. Điện di sản phẩm PCR đoạn gien *tlh* của *V. parahaemolyticus*

<u>*Ghi chú*</u>:

1. Marker ADN1kb; 2. VpPM1; 3. VpPM2;
4. VpPM3; 5. VpPM7; 6. VpPM4; 7. VpTSI;
8. ATCC17803

Hình 2. Điện di sản phẩm multiplexPCR đoạn gien *tlh* và gien *tdh* của *V. parahaemolyticus*

<u>*Ghi chú*</u>: 1. Marker ADN1kb; 2. *tlh*-VpPM4;
3. *tdh*-VpPM4; 4. *tlh* + *tdh* VpPM4;
5. *tlh*-ATCC17803; 6. *tdh*-ATCC17803;
7. *tlh* + *tdh*- ATCC17803

Bảng 3

Kết quả PCR xác định các gien *tlh* và *tdh*

STT	Tên chủng	Ký hiệu	Số lượng	Gien *tlh*	Gien *tdh*	Multilex PCR
1	V. *harveyi*	HW400	1	-	-	
2	*V. alginolyticus*	HW284	1	-	-	
3	*V. anguillarum*	HW72	1	-	-	
4	*V. alginolyticus*	Va.TSI	1	-	-	
5	*V. parahaemolyticus*	ATCC17803	1	+	+	+
6	*V. parahaemolyticus*	VpPM1	1	+	+	+
7	*V. parahaemolyticus*	VpPM2	1	-	-	
8	*V. parahaemolyticus*	VpPM3	1	+	-	
9	*V. parahaemolyticus*	VpPM4	1	+	-	
10	*V. parahaemolyticus*	VpPM6	1	+	-	
11	*V. parahaemolyticus*	VpPM7	1	+	-	
12	*V. parahaemolyticus*	Vp.TSI	1	+	-	
13	*Vibrio*.sp.	V.sp	28			
Tổng cộng			40	7	2	2

Ghi chú: HW: Heriot-Watt University; ATCC: Americal Type Culture Collection;
TSI: Viện nghiên cứu nuôi trồng thủy sản I,

III. KẾT LUẬN

Sử dụng phương pháp PCR phát hiện trong 7 chủng *V. parahaemolyticus* đã phân lập và định tên theo phương pháp vi sinh vật và bằng test thử API 20E đều có gien *tlh*. Như vậy chứng tỏ gien *tlh* là đặc hiệu cho *V. parahaemolyticus* và có thể sử dụng là gien đặc hiệu chỉ thị cho PCR để phát hiện *V. parahaemolyticus*. Với cặp mồi Vp-tdh do chúng tôi thiết kế là phù hợp cho PCR gien *tdh* để phát hiện các chủng có khả năng gây bệnh. Phương pháp multiplex PCR cho phép phát hiện đồng thời hai gien *tlh* và *tdh*, đem lại kết quả chính xác, nhanh chóng. Gien *tdh* của chủng VpPM4 phân lập từ mẫu tôm sú, có khác biệt về độ dài so với gien *tdh* của chủng ACTT 17803 vì vậy cần thiết khảo sát thêm tính đa dạng của gien *tdh* ở các chủng khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Asim K. Bej**, 1999: J. Microbio. Methods, 36: 215-225.
2. **De Paola A.**, **Hopkin L. H.**, 1990: Apply. Environ. Microbiol., 56: 2299-2302.
3. **Honda T.**, 1991: J.Gen. Microbiol., 137(2): 253–259.
4. **Nishibuchi M.**, 1985: J. Bacteriol., 162: 558-564.
5. **Nishibuchi M.**, 1995: Infection and Immunity, 63(6): 2093-2099.
6. **Promega**, 1996: Protocols and applications Guide; Third Edition; 175-176.
7. **Taniguchi H.**, **Ohra H.**, 1985: J. Bacteriology, 162: 510-515.
8. **Taniguchi H.**, 1986: Microbiol. Pathogen, 1: 425-432.

DETECTION OF THE THERMOLABILE HEMOLYSIN (*TLH*) AND THERMOSTABLE DRECT HEMOLYSIN (*TDH*) GENE OF V*IBRIO PARAHAEMOLYTICUS* BY PCR

**NGUYEN HOANG UYEN, NGUYEN CHI THUAN,
NGUYEN THI THANH LOI, NGUYEN THI HONG HANH**

SUMMARY

Vibrio parahaemolyticus is a halophytic bacterium found in black tiger shrimp culture ponds and is associated with shrimp diseases. All *V. parahaemolyticus* strains carry the thermolablile hemolysin (*tlh*) that appears to be species specificgene. The production of the thermostabile direct hemolysin (*tdh*) by *V. parahaemolyticus* is associated pathogenically qith the organism and is encoded by the *tdh* gene. The *V. parahaemolyticus* biochemical indentication method requires 5-8 days and did not detect the pathogen strains. The PCR and multiplex PCR methods which amplify *tlh* and *tdh* genes are used to detect various strains of *V. parahaemolyticus*. All 7 isolated *V. parahaemolyticus* strains are controlledby the API 20E showed and by PCR method, show the presemee of the *tlh* gene, however only two strains VpPM4 and ATCC17803 carry the *tdh* gene. The multiplex PCR method is also and successfully to detect these two strains VpPM4 and ATCC17803.

Ngày nhận bài: 18-6-2002

Công trình được hỗ trợ về kinh phí của Chương trình nghiên cứu cơ bản