

ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP PCR ĐỂ XÁC ĐỊNH VI KHUẨN *VIBRIO* *PARAHAEMOLYTICUS* GÂY BỆNH Ở CÁ

Application of PCR-based method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in fish

Huỳnh Văn Chương¹, Đặng Thanh Long¹, Hoàng Thị Kim Hồng², Huỳnh Thị Lệ², Nguyễn Văn Hiệp²,
Hoàng Thị Hồng Vân³, Phạm Trí Thuận⁴

¹Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tỉnh lộ 10, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

³Trường Đại học Nông lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

⁴Trường Trung học cơ sở và trung học phổ thông Nguyễn Văn Cừ, Thôn 16, Bò Ngoang, Chư Se, Gia Lai, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Huỳnh Văn Chương (Thư điện tử: hvanchuong@hueuni.edu.vn)
(Ngày nhận bài: 29–8–2019; Ngày chấp nhận đăng: 23–10–2019)

Tóm tắt. Dựa trên đặc điểm sinh hóa và phân tử của vi khuẩn *Vibrio* sp., ứng dụng phương pháp PCR với cặp mồi 16S-rRNA và giải trình tự gen rDNA 16S để xác định vi khuẩn *Vibrio* sp. Kết quả nghiên cứu cho thấy đã xác định được 2 chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* và 2 chủng vi khuẩn là *Vibrio vulnificus*. Kết quả của chúng tôi cho thấy tiềm năng cao của phương pháp PCR để xác định nhanh và cung cấp thông tin về mối quan hệ di truyền giữa các chủng vi khuẩn *Vibrio* ở tỉnh Thừa Thiên Huế.

Từ khóa: Cá, gen rDNA 16S, *Vibrio parahaemolyticus*

Abstract. The application of the PCR method with primers 16S-rRNA and sequence analysis of the rDNA 16S gene for the detection of *Vibrio* sp. in fish is presented in this paper. The results show that two strains are *Vibrio parahaemolyticus*, and two strains are *Vibrio vulnificus*. The PCR-based method is suitable for rapid identification and provides information on the genetic relationship of the *Vibriobacteria* strains found in Thua Thien Hue province.

Keywords: fish, rDNA 16S gene, *Vibrio parahaemolyticus*

1 Đặt vấn đề

Xuất huyết lở loét ở cá là một bệnh lây lan nhanh và xuất hiện tại nhiều nước trên thế giới. Bệnh gây thiệt hại lớn cho ngành nuôi trồng thủy sản. Bệnh do nhiều tác nhân gây ra, nhưng trong đó nguyên nhân đầu tiên là do nấm *Aphanomyces invadans*, virus, ký sinh trùng và vi khuẩn. Vi khuẩn gây bệnh lở loét ở cá đã được xác định thuộc các chi *Aeromonas*, *Vibrio*, *Plesiomonas*, và *Pseudomonas*. Loài *A. hydrophila* và *A. sobria* thuộc chi *Aeromonas* xuất hiện với tần suất lớn nhất, tiếp theo là chi *Vibrio* và *Plesiomonas* spp.

Ở Việt Nam, bệnh do vi khuẩn *Vibrio* sp. gây ra cho cá nuôi kéo dài từ Bắc vào Nam, lây lan nhanh, đặc trưng bởi nhiễm trùng huyết, xuất huyết và tổn thương da, trong đó có nhiều chủng *Vibrio parahaemolyticus* mang độc lực cao, có thể gây chết đến 30% đàn cá nuôi [1, 2]. Theo khóa phân loại của Bergey, *V. parahaemolyticus* là vi khuẩn gram âm, hình dấu phẩy, có tiêm mao ở một đầu, di động, kỵ khí tùy tiện và ưa môi trường kiềm mặn. Chúng thường sống ở các cửa sông và ven biển của hầu hết các vùng trên thế giới. Người ta đã phân lập được chúng trong cát, bùn, nước biển, cũng như ở hải sản [3]. *V. parahaemolyticus* có thể gây bệnh ở người thông qua tiêu thụ hải sản nấu chưa chín. Tuy nhiên, không phải chủng *V. parahaemolyticus* nào cũng gây bệnh do chúng mang các gen độc tố khác nhau. Trong số đó, hemolysin là độc tố phổ biến nhất ở các loài *Vibrio* gây bệnh. Đây là ngoại độc tố làm phân giải tế bào hồng cầu và giải phóng hemoglobin. Ở loài *V. parahaemolyticus*, có ba gen độc tố hemolysin chính bao gồm *tdh* và *trh* mã hóa các hemolysin bền nhiệt và *tlh* mã hóa hemolysin không bền nhiệt. Hai gen *tdh* và *trh* đều nằm trên operon độc tố *Vp-toxRS*, được điều hòa bởi gen *toxR* có trình tự bảo tồn cao trong loài [4]. Trong nghiên cứu này, một số vi khuẩn *Vibrio* phân lập từ cá có biểu hiện lở loét được định danh bằng phương pháp kỹ thuật phân tử, làm nguyên liệu để xác định một số gen độc tố của vi khuẩn.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Mẫu cá bị bệnh có biểu hiện xuất huyết lở loét thu được tại các lồng và ao nuôi ven biển Thừa Thiên Huế. Hóa chất tách chiết DNA, một số môi trường và vật liệu thường dùng trong phòng thí nghiệm

Hóa chất: CTAB (Sigma, Mỹ), Sodium dodecyl sulfate 10% (Merck, Đức), lysozyme, PCI (phenol:chloroform:isoamyl alcohol), ethanol, hóa chất thực hiện phản ứng PCR (DNA khuôn, mỗi xuôi, mỗi ngược, master mix, nước cất), hóa chất điện di (agarose, ethidium bromide, đệm TAE (1X))

Môi trường ChromoGel™ *Vibrio* agar, môi trường Alkaline Peptone Water (APW): 1% pepton, 1% NaCl, pH: 8,3–8,5

2.2 Phương pháp

Thu và xử lý mẫu, phân lập vi khuẩn trên môi trường ChromoGel™ *Vibrio* agar

Mẫu cá mắc bệnh được cho vào túi vô trùng và bảo quản trong đá trước khi đưa về phòng thí nghiệm. Các vùng lở loét, nội tạng và não của cá được đồng nhất bằng cối chày sứ và pha với nước muối sinh lý thành huyền dịch chứa vi khuẩn. Sau đó pha loãng dịch theo hệ số nhân 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , ... 10^{-7} , rồi cấy dàn đều lên bề mặt môi trường ChromoGel™ *Vibrio* agar trong đĩa Petri. Nuôi ở tủ ấm 37 °C trong 24 giờ. Chọn lọc những khuẩn lạc có hình thái giống của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trên môi trường ChromoGel™ *Vibrio* agar (khuẩn lạc hình tròn, bóng, có màu xanh) tăng sinh trong môi trường APW để thực hiện nhuộm Gram với mục đích bước đầu xác định vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Các chủng vi khuẩn có hình thái giống với hình thái của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* như: gram âm, hình que hoặc

phẩy khuẩn, bắt màu thuốc nhuộm màu hồng thì được tiến hành tạo dòng thuần và nuôi tăng sinh trong môi trường APW để tách chiết DNA tổng số.

Tách chiết DNA tổng số của các chủng vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn được nuôi trên môi trường APW, lắc ở 150 vòng/phút trong 18 giờ. Dịch nuôi cấy được ly tâm ở 13.000 vòng/phút ở 4 °C để thu tế bào. DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp CTAB (cetyl trimethylammonium bromide): phá vỡ tế bào bằng cách bổ sung 500µL CTAB, 30µL Sodium dodecyl sulfate 10%, 25µL lysozyme vào ống eppendorf chứa tế bào, vortex, ủ nhiệt ở 70 °C trong 30 phút. Kết tủa DNA bằng ethanol 100% và bảo quản trong tủ lạnh ở –20 °C trong 60 phút. Kết tủa DNA bằng cách ly tâm 15.000 vòng/phút trong 10 phút và rửa DNA lại 2 lần bằng ethanol 70%. Sau đó, để khô tại nhiệt độ phòng và tái huyền phù DNA bằng cách cho thêm vào 50 µL Tris- Ethylene diamine tetraacetic acid. DNA tổng số được điện di kiểm tra trên agarose gel 1,5%.

Định danh các chủng vi khuẩn bằng phương pháp sinh học phân tử

DNA tổng số được sử dụng làm khuôn để tiến hành định danh bằng kỹ thuật phân tử dựa trên sự tương đồng của gen rDNA 16S với cặp mồi 16S-rRNA: F: 5'-CGTGCCAGCAGCCGCGGTAA-3', R: 5'-GCCCCGGAACGTATTCACCG-3' [5]. Thành phần phản ứng gồm 50 ng DNA tổng số, 10 pmol mồi xuôi, 10 pmol mồi ngược, 5 µL đệm PCR (10X), 20 µL Master Mix 2X và bổ sung nước cất vô trùng cho đủ thể tích 50 µL. Thực hiện chu trình nhiệt: 95 °C/5 phút; tiếp đến là 30 chu kỳ: 95 °C/45 giây, 57 °C/30 giây, và 72 °C/1 phút; cuối cùng là 72 °C/7 phút. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên agarose gel 1,5% và nhuộm bằng ethydiumbromide (EtBr 0,5 µg/L) và quan sát hình ảnh điện di dưới ánh sáng tử ngoại bằng hệ thống Gel Documentation (BioRad).

Giải và phân tích trình tự

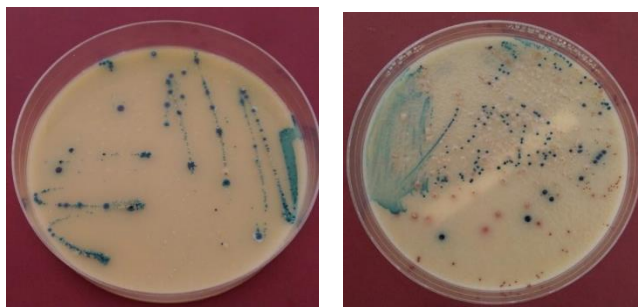
Sản phẩm PCR sau khi kiểm tra được tinh sạch bằng bộ KIT Isolate II PCR and Gel (BioLine) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và sử dụng làm khuôn trực tiếp cho phản ứng tiền giải trình tự gen theo nguyên tắc dye-labelled dideoxy terminator. Các chủng vi khuẩn được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử với cặp mồi 16S-rRNA. Mức độ tương đồng của đoạn gen rDNA 16S ở các chủng trong nghiên cứu này được so sánh với trình tự Nucleotide của các đoạn rDNA 16S của các chủng vi khuẩn khác đã được đăng ký trên ngân hàng gen bằng cách BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) trên GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) và xây dựng cây phát sinh bằng phần mềm Mega 7.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Phân lập vi khuẩn trên môi trường ChromoGel™ *Vibrio* Agar

Tiến hành phân lập vi khuẩn *Vibrio* sp. trên môi trường ChromoGel™ *Vibrio* agar (Hình 1) đối với mẫu cá có biểu hiện xuất huyết và lở loét. Kết quả cho thấy các khuẩn lạc mọc lên trên môi trường

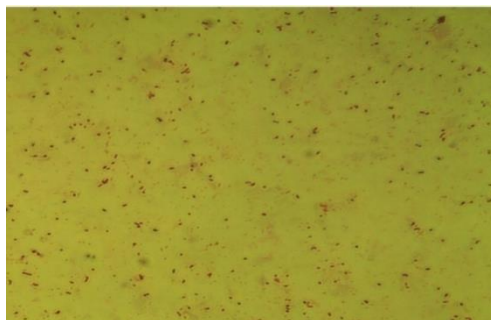
ChromoGel™*Vibrio* agar có 3 loại màu sắc khác nhau như: khuẩn lạc màu hồng đỏ đại diện cho *V. cholerae*, màu trắng hơi vàng đại diện cho *V. Alginolyticus* và màu xanh đậm đại diện cho *V. parahaemolyticus*. Dựa trên cơ sở đó chúng tôi đã thu được 25 khuẩn lạc có đặc điểm giống với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* như khuẩn lạc màu xanh đậm, tròn đều và bóng. Từ 25 chủng vi khuẩn thu được đó, chúng tôi tiến hành nhuộm Gram và quan sát dưới kính hiển vi để bước đầu sàng lọc và chọn những vi khuẩn có khả năng cao là vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc được phân lập trên môi trường ChromoGel™*Vibrio* agar

3.2 Nhuộm Gram vi khuẩn

Các khuẩn lạc được chọn tiến hành nhuộm Gram để xác định hình thái, kích thước và một số đặc điểm cơ bản để xác định vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Kết quả quan sát dưới kính hiển vi (Hình 2) cho thấy được hình thái của các chủng vi khuẩn thu được có đặc điểm như: hình que hoặc phẩy khuẩn gram (-), đứng riêng lẻ, bắt màu hồng. Qua kết quả nhuộm gram thì từ 25 chủng vi khuẩn ban đầu chúng tôi xác định được 6 chủng vi khuẩn có khả năng bắt màu đặc trưng của vi khuẩn gram (-) khi nhuộm với các đặc điểm như hình que, đứng riêng lẻ, bắt màu hồng. Tiến hành tạo dòng thuần 6 chủng thu được để tiếp tục tách chiết DNA tổng số.



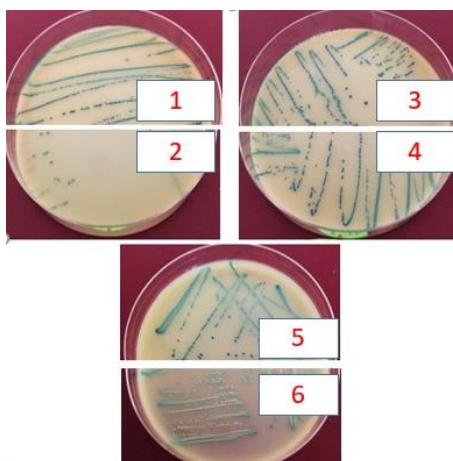
Hình 2. Ảnh nhuộm gram của các chủng vi khuẩn quan sát dưới kính hiển vi (40×)

3.3 Tạo dòng thuần các chủng vi khuẩn trên môi trường ChromoGel™ *Vibrio* agar

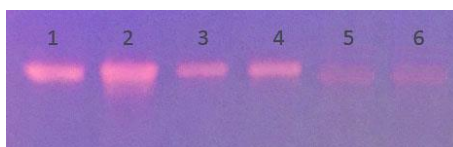
Sau ba lần cấy chuyển liên tiếp trên môi trường ChromoGel™ *Vibrio* agar, chúng tôi thu được dòng thuần của 6 chủng vi khuẩn dự đoán *V. parahaemolyticus*. Các chủng vi khuẩn sau khi tạo dòng thuần được tiến hành tăng sinh trong các ống nghiệm chứa 5 mL dung dịch APW nuôi ở 37 °C và lắc ở 150 vòng/phút. Kết quả cho thấy cả 6 chủng vi khuẩn đều cho sinh khối tốt (Hình 3). Tiến hành thu sinh khối và tách chiết DNA tổng số.

3.4 Tách DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết từ 6 chủng vi khuẩn, mỗi mẫu hòa tan trong 50μL TE. Chất lượng DNA tổng số được kiểm tra bằng điện di trên diagarose gel 1,5%. Trong 6 chủng vi khuẩn phân lập được (Hình 4) có 4 chủng vi khuẩn (Vp1.1, Vp1.2, Vp1.3, Vp1.4). DNA tổng số sau khi tách chiết không bị đứt gãy, sạch và có nồng độ cao. Các chủng còn lại (Vp1.5, Vp1.6) DNA sau khi tách chiết thu được nồng độ thấp hơn so với chủng Vp1.1,2,3,4. Nguyên nhân có thể do quá trình tách chiết DNA, sinh khối tế bào thấp dẫn đến nồng độ DNA chưa cao. Từ đó chúng tôi chọn các chủng Vp1.1, Vp1.2, Vp1.3, Vp1.4 để thực hiện PCR định danh vi khuẩn.



Hình 3. Kết quả phân lập các chủng vi khuẩn trên môi trường ChromoGel™ *Vibrio* agar
Chú thích: 1, 2, 3, 4, 5, 6: tương ứng với các chủng Vp1.1, Vp1.2, Vp1.3, Vp1.4, Vp1.5, Vp1.6 của mẫu cá phân lập.



Hình 4. Kết quả tách chiết DNA tổng số của 6 chủng vi khuẩn sau khi phân lập
Chú thích: 1, 2, 3, 4, 5, 6: tương ứng với các chủng Vp1.1, Vp1.2, Vp1.3, Vp1.4, Vp1.5, Vp1.6 của mẫu cá phân lập.

3.5 Định danh vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR

Vi khuẩn có băng DNA khuếch đại với kích thước gen nằm trong khoảng 800–900 bp. Băng DNA rõ chứng tỏ tính đặc hiệu cao (Hình 5). Sau khi có kết quả PCR với cặp mồi 16S-rRNA thì chúng tôi tiến hành tinh sạch sản phẩm bằng bộ kit PCR clean up system (Promega) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và sử dụng làm khuôn trực tiếp cho phản ứng tiền giải trình tự theo nguyên tắc dye-labelled dideoxy terminator và định danh với cặp mồi 16S-rRNA.

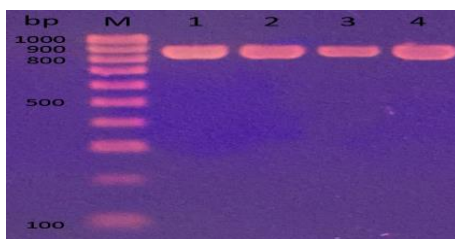
3.6 Giải trình tự gen và xây dựng cây phả hệ

Các chủng vi khuẩn được phân lập trên môi trường ChromoGel™ *Vibrio* agar, nhuộm Gram và đồng thời định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử dựa trên việc giải trình tự gen rDNA 16S. Sản phẩm PCR với cặp mồi nhận biết đoạn gen có kích thước khoảng 878 bp của rDNA 16S (Hình 5) được tinh sạch và giải trình tự Nucleotide. Kết quả giải trình tự của các chủng Vp1.1, Vp1.2, Vp1.3, Vp1.4 không được trình bày ở đây.

3.7 Định danh loài và xây dựng cây phả hệ

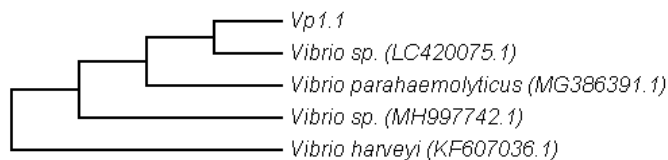
Trình tự nucleotide của đoạn gen rDNA 16S của các chủng Vp1.1, Vp1.2, Vp1.3, Vp1.4 được chúng tôi so sánh với dữ liệu trên ngân hàng GenBank cho kết quả như sau:

Trình tự nucleotide của chủng Vp1.1 tương đồng cao với trình tự nucleotide của các chủng *Vibrio* như *Vibrio* sp. (mã số: MH997742.1), *Vibrio* sp. (mã số: LC420075.1), *Vibrio parahaemolyticus* (mã số: MG386391.1), *Vibrio harveyi* (mã số: KF607036.1) (Hình 6). Do đó, chủng Vp1.1 được đặt tên là *Vibrio parahaemolyticus* 1.1.



Hình 5. Kết quả chạy PCR của 4 chủng vi khuẩn với cặp mồi 16S-Rna

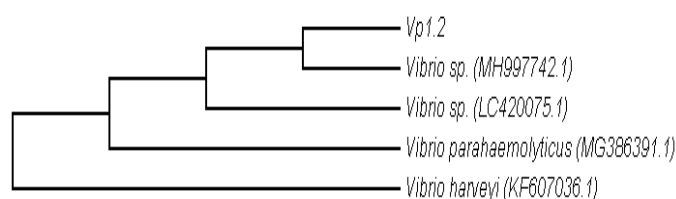
Chú thích: M là thang chuẩn khối lượng (100–1000 bp); 1,2,3,4: là số thứ tự của 4 chủng tương ứng Vp1.1, Vp1.2, Vp1.3, Vp1.4.



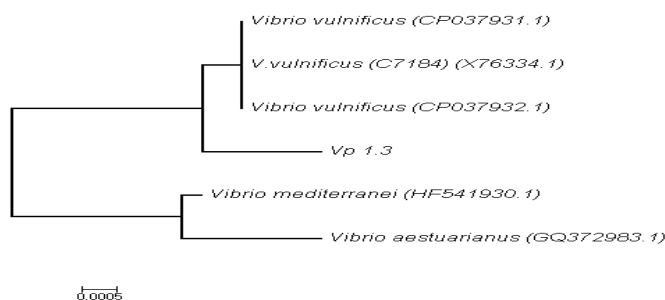
Hình 6. Cây phả hệ di truyền của chủng Vp1.1 so với một số chủng *Vibrio* spp. trên ngân hàng GenBank

Tương tự, trình tự nucleotide của chủng Vp1.2 tương đồng cao với trình tự nucleotide của các chủng *Vibrio* như *Vibrio* sp. (mã số: MH997742.1), *Vibrio* sp. (mã số: LC420075.1), *Vibrio parahaemolyticus* (mã số: MG 386391.1), *Vibrio harveyi* (mã số: KF607036.1) (Hình 7). Do đó, chủng Vp1.2 đặt tên là *Vibrio parahaemolyticus* 1.2.

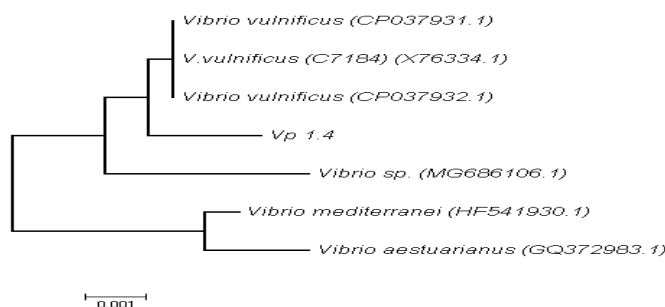
Tương tự, chúng tôi tiến hành so sánh kết quả trình tự nucleotide của hai chủng còn lại là chủng Vp1.3, Vp1.4 với dữ liệu trên ngân hàng GenBank. Kết quả cho thấy chủng Vp1.3, Vp1.4 có mức độ tương đồng cao với các chủng *Vibrio vulnificus* (mã số: CP037931.1), *V. vulnificus* (mã số: C(718)(X76334.1)), *Vibrio vulnificus* (mã số: CP037932.1), *Vibrio mediterranei* (mã số: HF541930.1), *Vibrio aestuarianus* (mã số: GQ372983.1) (Hình 8 và Hình 9). Do đó, các chủng Vp1.3, Vp1.4 được đặt tên lần lượt là *Vibrio vulnificus* 1.3 và *Vibrio vulnificus* 1.4.



Hình 7. Cây phả hệ di truyền của chủng Vp1.2 so với một số chủng *Vibrio* spp trên ngân hàng GenBank



Hình 8. Cây phả hệ di truyền của chủng Vp1.3 so với một số chủng *Vibrio* spp trên ngân hàng GenBank



Hình 9. Cây phả hệ di truyền của chủng Vp1.4 so với một số chủng *Vibrio* spp. trên ngân hàng GenBank

4 Kết luận

Mẫu cá mắc bệnh có biểu hiện sung huyết, xuất huyết và lở loét được thu tại các lồng và ao nuôi đã được chúng tôi phân lập trên môi trường chọn lọc ChromoGel™*Vibrio* agar cho các khuẩn lạc màu xanh đậm, tròn đều và bóng. Khuếch đại vùng gen rDNA 16S có kích thước khoảng 878 bp. Gen sau khi giải trình tự và so sánh với trình tự gen được công bố trên ngân hàng GenBank có mức độ tương đồng 98–100%. Từ đó đã xác định được 2 trong 4 chủng vi khuẩn phân lập được là *Vibrio parahaemolyticus* 1.1 và 1.2 và 2 chủng là *Vibrio vulnificus* 1.3 và 1.4. Chúng là cơ sở khoa học cho các nghiên cứu liên quan đến một số độc tố của vi khuẩn.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được thực hiện bằng kinh phí của đề tài thuộc chương trình Cấp bộ mã số CT-2018-DHH-03.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Thị Hòa, Trần Vũ Hích, Nguyễn Thị Thùy Giang, Phan Văn Út, Nguyễn Thị Nguyệt Huệ. Các loại bệnh thường gặp trên cá biển nuôi ở Khánh Hòa. Tạp chí Khoa học, Công nghệ Thủy sản. 2008;20(2): 16–24.
2. Bùi Quang Tề. Bệnh của cá mú nuôi lồng ở vịnh Hạ Long. Báo cáo tại hội nghị Nuôi Trồng Thủy sản toàn quốc.
3. Westh T, Wassenaar T M, Hallin PF, Snipen L, Lagesen K, Ussery DW. On the origins of a *Vibrio* species. Microb Ecol. 2010; 59: 1–13.
4. Nishibuchi M, Kaper JB. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. Infect Immun. 1995; 63(6): 2093–2099.
5. Đặng Thị Lua, Nguyễn Việt Khuê, Phan Thị Vân. Non – *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) trên tôm nuôi. Tạp chí Khoa học nông nghiệp Việt Nam. 2016; 14 (5): 690–698.