

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH DUPLEX RT-qPCR PHÁT HIỆN CMNV (*Covert Mortality Nodavirus*) GÂY BỆNH TRÊN TÔM THẺ CHÂN TRẮNG

Đỗ Thị Như Thảo¹, Nguyễn Phạm Trúc Phương², Lương Thị Ngọc Hân³, Nguyễn Trần Đức Duy⁴, Nguyễn Thị Loan⁵, Hoàng Đức Hiệt⁶

Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao

TÓM TẮT

Trong các bệnh do virus gây ra trên tôm thì bệnh có tỉ lệ tôm chết cao và lây lan nhanh là bệnh do virus *CMNV* (*Covert Mortality Nodavirus*) gây ra hội chứng tôm chết bí ẩn. *CMNV* có khả năng lây lan nhanh chóng ra xung quanh và dự báo nguy cơ bùng phát trên diện rộng nếu không có biện pháp ngăn chặn kịp thời. Nghiên cứu xây dựng quy trình duplex RT-qPCR phát hiện virus *CMNV* gây bệnh trên tôm thẻ chân trắng. Phương pháp duplex RT-qPCR sử dụng Taqman probe được phát triển và tối ưu hóa với tỷ lệ nồng độ mỗi *RdRp*/ β -actin lần lượt là 300nM/300nM; nồng độ probe tương ứng 300nM/200nM cho trình tự mục tiêu gen *RdRp* được xây dựng trên bộ hóa chất PerfeCTa® qPCR FastMix® II, Low ROX™. Với chu trình nhiệt là 95°C trong 2 phút; 40 chu kỳ 95°C trong 5 giây; 60°C trong 30 giây. Xác định được các thông số kỹ thuật như độ chọn lọc (100%), giới hạn phát hiện (LOD_{50}) với nồng độ 5-10 copy/ phản ứng trên DNA plasmid và nồng độ 12pg/ phản ứng trên cDNA ly trích. Độ biến thiên nội phản ứng của quy trình ở các nồng độ DNA có %CV từ 0,98% đến 1,94% và độ biến thiên liên phản ứng thấp nhất là 0,70%, còn hệ số biến thiên liên phản ứng cao nhất 1,91%.

Từ khóa: β -actin, *CMNV* (*Covert Mortality Nodavirus*), duplex RT-qPCR, gen *RdRp*, tôm thẻ chân trắng.

MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, các đợt bệnh truyền nhiễm ở các ao nuôi đã gây ra thiệt hại kinh tế lớn cho ngành nuôi tôm thế giới. Gần đây, một bệnh virus tôm mới nổi khác đang đe dọa ngành tôm ở Trung Quốc, một trong những nước sản xuất tôm hàng đầu thế giới. Căn bệnh này được gọi là “Hội chứng tôm chết bí ẩn”, do tôm chết nhiều ẩn dưới đáy nước sâu thay vì bơi lên mặt nước hoặc vùng nước nông như tôm bị bệnh đốm trắng. Sau đó đã phát hiện 1 loài virus mới có cấu trúc RNA, được đặt tên chính thức là *CMNV* thuộc phân họ Nodaviridae (Zhang *et al.*, 2014). *CMNV* được phát hiện lần đầu tiên vào đầu năm 2009 tại các ao nuôi tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) mật độ cao, nơi mầm bệnh phát triển gây chết cao. Tỷ lệ gây chết của *CMNV* có thể tích lũy theo mật độ nuôi, có thể đạt tới mức 80-90% trong một số trường hợp. Từ năm 2013 đến năm 2015 đã có rất nhiều các cuộc điều tra dịch tễ học tiếp theo cho thấy *CMNV* phổ biến ở hầu hết các loại tôm như tôm thẻ chân trắng, tôm chân trắng Trung Quốc, tôm he Nhật Bản, tôm sú và tôm càng xanh. Ngoài ra đã có nhiều nghiên cứu về các vật chủ trung gian lây truyền *CMNV* như amphiod, ốc mượn hồn, còng, *Tubuca arcuata* đều phát hiện dựa trên trình tự gen *RdRp* (*RNA-dependent RNA polymerase*) mục tiêu của *CMNV* thông qua phương pháp RT-LAMP và RT-nPCR. Tỷ lệ nhiễm *CMNV* lên tới 31,8% tại các ao nuôi tôm phân bố dọc theo vùng ven biển các tỉnh của Trung Quốc (Zhang *et al.*, 2017). Trong nghiên cứu khác của Zhang và đồng tác giả (2017), đã phát hiện virus *CMNV* có mặt trên *Litopenaeus vannamei*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Marsupenaeus japonicus* bằng các xét nghiệm mô học và phương pháp RT-PCR. Nhằm kiểm soát nguy cơ bùng dịch trên diện rộng, nhóm tác giả đã xây dựng và tối ưu hóa quy trình phát hiện virus *CMNV* bằng kỹ thuật RT-LAMP với các thông số tối ưu như sau: 6 mM MgCl₂ và 1,6 mM dNTP, nhiệt độ ủ là 65°C và thời gian phản ứng là 50 phút (Zhang *et al.*, 2017). Ưu điểm của kỹ thuật này so với các phương pháp chuẩn đoán khác như thời gian trả kết quả nhanh, hạn chế việc nhiễm chéo của mẫu, quan sát kết quả bằng mắt thường, thuận tiện cho việc xét nghiệm tại chỗ. Việc chuẩn đoán mầm bệnh do *CMNV* gây ra bằng phương pháp mô học là rất khó khăn do sự biến đổi không rõ ràng. Bên cạnh đó, việc phát hiện ra *CMNV* trong mang, gan tụy, chân ngực và cơ cũng rất khó khăn do kích thước rất nhỏ. Trong đó, qPCR dựa trên đầu dò TaqMan là một phương pháp có độ nhạy và độ tin cậy cao cho phép phát hiện nhanh và chính xác các mầm bệnh virus, có khả năng phát hiện được sự hiện diện của virus trong thời kỳ ủ bệnh, là phương pháp phổ biến nhất được khuyến dùng cho phát hiện và định lượng cho động vật thủy sinh. Tính đến thời điểm hiện tại, Việt Nam vẫn chưa có công bố nào về trường hợp tôm nhiễm virus *CMNV*. Để chủ động phòng chống – kiểm soát dịch bệnh lây lan nhóm tác giả thực hiện nghiên cứu xây dựng quy trình RT-qPCR dựa trên đầu dò TaqMan để vừa khuếch đại gen mục tiêu và gen chứng nội nhằm kiểm soát quy trình với các thông số kỹ thuật đáp ứng yêu cầu ứng dụng phân tích phát hiện virus nhanh và chính xác.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu

Mỗi xuôi, mỗi ngược, 2X PerfeCTa® qPCR FastMix® II, Low ROX™, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems™, RNA tôm, chứng dương được cung cấp bởi công ty DNA Sequencing, plasmid chứng dương sử dụng trình tự trên NCBI được tổng hợp bởi công ty IDT- Mỹ.

Ly trích RNA tổng số của các mẫu tôm

Các mẫu tôm được thu thập ở các địa điểm khác nhau trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh. RNA tổng số của các mẫu tôm được ly trích bằng kit tách chiết TopPURE[®] Tissue Viral Extraction theo hướng dẫn nhà sản xuất. Sau quá trình ly trích RNA, các mẫu tôm được ly trích RNA được định tính và định lượng bằng máy đo BioPhotometer Plus hãng Eppendorf. Tiếp tục, thực hiện phản ứng phiên mã ngược thành cDNA sử dụng bộ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher), cDNA sau phiên mã ngược được bảo quản ở -20°C đến 4°C để sử dụng cho phản ứng tiếp theo.

Thiết kế mồi và probe đặc hiệu để phát hiện CMNV gây bệnh trên tôm

Đoạn mồi và probe phát hiện virus CMNV được thiết kế cho dựa trên trình tự gen *RdRp* của bộ gen CMNV trên Genbank (KM112247). Cặp mồi và probe β -actin được thiết kế dựa trên đoạn gen β -actin mRNA của tôm (AF300705.2). Các đoạn mồi và probe được thiết kế với sự trợ giúp của phần mềm Primer3. Bên cạnh đó, nghiên cứu có tham khảo thêm cặp mồi và probe phát hiện CMNV được dựa trên gen *RdRp* bằng phương pháp RT-qPCR với độ nhạy 5,7 copies/ phản ứng đã được công bố bởi Li và đồng tác giả (Li *et al.*, 2018). Mồi sau khi thiết kế được đánh giá các thông số vật lý như độ dài, nhiệt độ nóng chảy, phần trăm GC, năng lượng hình thành cấu trúc bậc hai... bằng phần mềm trực tuyến IDT. Bên cạnh đó tính đặc hiệu được kiểm tra bằng chương trình Annyb.

Kiểm tra độ hoạt động thực tế của mồi và probe

Sau khi mồi được tổng hợp, phản ứng qPCR được thực hiện với các thành phần phản ứng PCR với DNA chứng dương đặc hiệu cho virus CMNV và gen chứng nội β -actin trên DNA ly trích từ mẫu tôm trắng để đánh giá khả năng hoạt động của mồi. Tiếp tục kiểm tra độ hoạt động thực tế của probe với các thành phần phản ứng cơ bản của phản ứng qPCR, DNA chứng dương đặc hiệu cho virus CMNV và DNA ly trích từ mẫu tôm trắng. Chỉ tiêu theo dõi: Tín hiệu huỳnh quang và chu kỳ ngưỡng C_T .

Xây dựng và tối ưu hóa quy trình duplex RT-qPCR phát hiện CMNV gây bệnh trên tôm

Hỗn hợp phản ứng RT-qPCR bao gồm 2X PerfeCTa[®] qPCR FastMix[®] II, Low ROX[™] 10 μ L, mẫu DNA 1 μ L, nồng độ mồi và probe được tối ưu bằng phương pháp ma trận 5x5. Theo đó, nồng độ gradient cuối cùng của các mồi là 100, 200, 300, 400, 500 (nM); của probe gen *RdRp* là 100, 200, 300, 400, 500 (nM), probe chứng nội là 50, 100, 150, 200, 250 (nM) và nước không có nuclease được bổ sung đủ thể tích 25 μ L. Phản ứng khuếch đại được thực hiện trên máy Mx3005P[™] qPCR system (Agilent technologies). Chu kỳ nhiệt qPCR: 95°C trong 2 phút, 40 chu kỳ ở 95°C trong 5 giây và 55-65°C trong 30 giây. Khi phản ứng qPCR kết thúc, dựa vào kết quả C_T và ΔRn thu được để chọn những giá trị tối ưu nhất.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Mồi, probe và đánh giá các đặc tính của mồi, probe

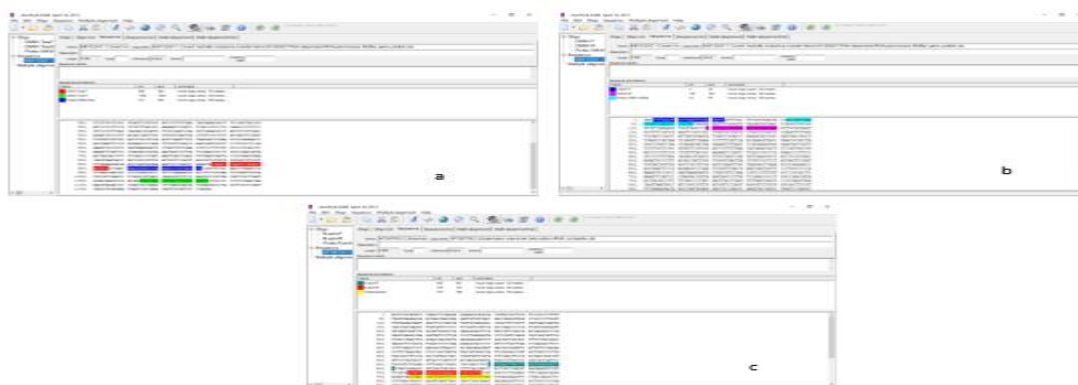
Trình tự mồi và probe để khuếch đại đoạn mồi *RdRp* và gen chứng nội có trình tự như Bảng 1. Các đặc tính vật lý được đánh giá bằng phần mềm IDT cũng được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Trình tự mồi và probe sử dụng trong nghiên cứu

Mồi và probe	Trình tự nucleotide	Chiều dài (bp)	Tm (°C)	%GC	(1)	(2)	(3)
CMNV-Taq-F	CGAGCTAATCCAAGCACTTC	198	53,50	50,00	-1,63	-0,96	-0,96
CMNV-Taq-R	ACCTGTTAGGTACGCTACCA		55,10	50,00	-1,34	-0,96	-0,96
Probe CMNV- Taq	6-carboxyfluorescein (FAM) – CGCTCA CGGCTTTGGATACCTT - N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhododamine (TAMRA)		59,70	54,50	-0,28	-0,96	-1,34
RdRp-F	TCTAAGTACCGATTCGAGATC	137	50,80	42,90	0,10	-0,96	-0,96
RdRp-R	GTGTTATGATCTGTGGTAGTC		50,20	42,90	0,51	-0,96	-0,96
Probe RdRp	6-carboxyfluorescein (FAM) – ACCATCAACTGTCCAGCCCGCGCCA - N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhododamine (TAMRA)		68,70	64,00	0,39	-1,34	-1,57
β -actin-F	ACAGACTACCTGATGAAGATCC	98	53,50	45,50	-2,06	-0,96	-1,34
β -actin-R	TAGCACAGTTTCTCCTTGATGT		53,90	40,90	1,30	-0,96	-1,34
Probe β -actin	/5HEX/CCACCGCTG/ZEN/CTTCCTC CTCCTCGC/3IABkFQ/		67,60	70,80	1,30	-3,14	-1,60

Chú thích: Tm: nhiệt độ nóng chảy; (1) ΔG của cấu trúc kẹp tóc (hairpin-loop) (kcal/mol); (2) ΔG của cấu trúc self-dimer (kcal/mol); (3) ΔG của cấu trúc hetero-dimer (kcal/mol).

Dựa vào Bảng 1, giá trị vật lý với nhiệt độ nóng chảy (T_m) của cặp mồi CMNV-Taq-F/R (T_m : 53,50°C với 55,10°C), cặp mồi RdRp-F/R (T_m : 50,80°C với 50,20°C), cặp mồi gen chứng nội β -actinF/R trên tôm (T_m : 53,50°C với 53,90°C) có nhiệt độ nóng chảy ở mỗi xuôi và mỗi ngược không chênh lệch với nhau lớn vì khi chênh lệch nhau quá 5°C đoạn mồi sẽ không gắn vào trình tự mục tiêu và không tạo ra được sản phẩm khuếch đại. Các đoạn probe CMNV-Taq; RdRp và β -actin có chiều dài nu của lần lượt là 22 nu, 25 nu, 24 nu; không có đầu G ở đầu 5'; đoạn probe có nhiều nu C hơn nu G. Bên cạnh đó, probe CMNV-Taq; RdRp và β -actin có %GC lần lượt là 54,5%; 64,0% và 70,8% đều nằm trong khoảng 30% đến 80%. Theo Phạm Hùng Vân (2011), các probe thiết kế phải thỏa mãn những yêu cầu sau: (1) probe phải nằm gần mồi; (2) chiều dài phải ngắn hơn 30 nu; (3) không nên có G ở đầu 5' vì G hấp thụ tín hiệu huỳnh quang dẫn đến sai lệch về kết quả; (4) hàm lượng GC trong probe nằm trong khoảng 30-80%; (5) probe phải có nhiều base C hơn G; (6) nhiệt độ nóng chảy của mẫu dò phải lớn hơn nhiệt độ của mồi từ 8-10°C. Nhưng ở probe RdRp và probe β -actin T_m của probe lần lượt là 68,7°C; 67,6°C đều lớn hơn nhiệt độ mồi khoảng 20°C. Tuy nhiên, các thông số của hai probe RdRp và probe β -actin đều thỏa mãn các đáp ứng điều kiện thiết kế probe như nằm gần đoạn mồi, có chiều dài ngắn hơn 30 nu, không nên có G ở đầu 5',... Như vậy trên lý thuyết, các mồi và probe được lựa chọn trong nghiên cứu này thỏa mãn các điều kiện về đặc tính oligonucleotide để có thể hoạt động tốt trong phản ứng RT-qPCR như về T_m , hàm lượng GC, các cấu trúc thứ cấp. Tính đặc hiệu được kiểm tra bằng chương trình Anhyb cho thấy các cặp mồi và probe tương ứng chỉ bắt cặp đặc hiệu vào trình tự gen đích với mức độ tương đồng 100%.

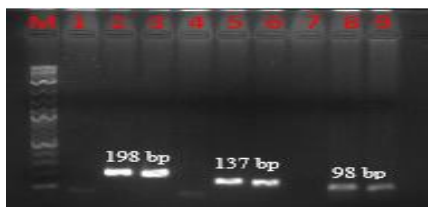


Hình 1. (a) Sự bắt cặp của cặp mồi và probe CMNV-Taq lên trình tự RdRp của CMNV; (b) Sự bắt cặp của cặp mồi và probe RdRp lên trình tự RdRp của CMNV; (c) Sự bắt cặp của cặp mồi và probe β -actin lên trình tự β -actin

Kiểm tra độ hoạt động thực tế của mồi và probe

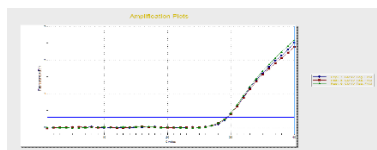
Kiểm tra khả năng hoạt động thực tế của cặp mồi CMNV-Taq-F/ CMNV-Taq-R, cặp mồi RdRp -F/ RdRp -R, cặp mồi β -actin-F/ β -actin-R bằng cách thực hiện với các thành phần phản ứng PCR với DNA chứng dương đặc hiệu cho virus CMNV và gen chứng nội β -actin trên DNA ly trích từ mẫu tôm trắng để đánh giá khả năng hoạt động của mồi. Kết quả cho thấy, sản phẩm khuếch đại của phản ứng PCR lần lượt là 198bp, 137bp, 98bp phù hợp với kích thước trình tự gen mục tiêu RdRp, β -actin (Hình 2). Các sản phẩm PCR được đem đi gửi tại Trung tâm Nghiên cứu Thử nghiệm Hóa Dược để khẳng định trình tự gen của virus CMNV. Kết quả giải trình tự sẽ được so sánh các trình tự với trình tự gen sẵn có trong NCBI genebank bằng cách sử dụng BLAST alignment để nhận diện. Kết quả giải trình tự sản phẩm PCR với cặp mồi CMNV-Taq-F/ R cho độ tương đồng 94,83% và cặp mồi RdRp-F/R cho độ tương đồng 98,57% với trình tự mục tiêu của gen RdRp.

Khả năng hoạt động của đoạn dò với cặp mồi tương ứng được thực hiện bằng phản ứng qPCR với tín hiệu huỳnh quang vượt ngưỡng. Cặp mồi CMNV-Taq, RdRp sử dụng probe gắn màu FAM, cặp mồi β -actin sử dụng probe gắn màu HEX. Các probe đều cho tín hiệu huỳnh quang vượt ngưỡng tương ứng với các cặp mồi (Hình 3, Hình 4, Hình 5).

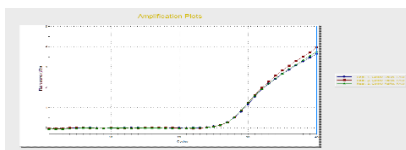


Hình 2. Kết quả PCR khuếch đại DNA của cặp mồi CMNV-Taq-F/R, RdRp-F/R, β -actinF/R

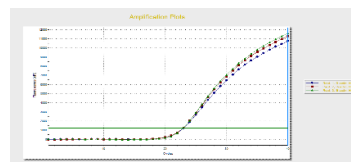
M: Thang DNA; Giếng (1): Mẫu âm với cặp mồi CMNV-Taq-F/R; Giếng (2), (3): DNA chứng dương với cặp mồi CMNV-Taq-F/R; Giếng (4): Mẫu âm với cặp RdRp-F/R; Giếng (5),(6): DNA chứng dương với cặp mồi RdRp-F/R; Giếng (7): Mẫu âm với cặp mồi β -actinF/R; Giếng (8), (9): DNA chứng dương với cặp mồi β -actinF/R



Hình 3. Biểu đồ khuếch đại tín hiệu huỳnh quang của cặp mồi và probe CMNV-Taq gắn màu FAM



Hình 4. Biểu đồ khuếch đại tín hiệu huỳnh quang của cặp mồi và probe RdRp gắn màu FAM



Hình 5. Biểu đồ khuếch đại tín hiệu huỳnh quang của cặp mồi và probe β -actin gắn màu HEX

Tiến hành dựng đường chuẩn từ 10^3 copies/ phản ứng đến 10^6 copies/ phản ứng để đánh giá hiệu quả khuếch đại trình tự mục tiêu thì cặp mồi và probe RdRp cho hiệu suất là 98,60% cao hơn so với cặp mồi và probe CMNV-Taq là 92,20%. Do đó, cặp và probe RdRp được lựa chọn để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Xây dựng và tối ưu hóa quy trình duplex RT-qPCR phát hiện CMNV gây bệnh trên tôm

Nồng độ mồi là yếu tố cơ bản quyết định đến sự thành công của phản ứng qPCR. Nhằm tối ưu hóa phản ứng khảo sát các nồng độ mồi từ 100-500nM với độ tăng là 100nM trên cùng 1 nồng độ DNA plasmid dương tính CMNV. Gen β -actin được sử dụng làm chứng nội như một biện pháp kiểm soát quá trình ly trích (chống kết quả âm tính giả) trong quy trình xây dựng. Kết quả tối ưu nồng độ mồi CMNV-Taq/ β -actin ở tỷ lệ 300nM/300nM là tối ưu nhất, có khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại của thí nghiệm (Bảng 2).

Nồng độ probe cũng là 1 yếu tố quan trọng trong phản ứng duplex qPCR. Nồng độ probe tối ưu cho phản ứng qPCR được khảo sát đi từ 100 đến 500nM với độ tăng là 100nM đối với probe của gen đặc hiệu RdRp và probe của gen chứng nội β -actin được khảo sát ở nồng độ từ 50 đến 250nM với độ tăng là 50nM cùng một nồng độ DNA plasmid 10^3 copies và cDNA ly trích từ tôm, nhằm tìm ra tỷ lệ nồng độ cho giá trị C_T nhỏ nhất, cường độ tín hiệu huỳnh quang cao nhất. Kết quả bảng 3 cho thấy tỷ lệ 300nM/200nM là nồng độ phù hợp cho phản ứng duplex qPCR phát hiện trình tự gen mục tiêu RdRp của CMNV và gen chứng nội β -actin để kiểm soát phản ứng.

Bảng 2. Kết quả tối ưu nồng độ mồi CMNV-Taq/ β -actin trên DNA plasmid 10^3 copies và gen chứng nội β -actin

Nồng độ mồi CMNV-Taq/ β -actin	FAM	HEX	Nồng độ mồi CMNV-Taq/ β -actin	FAM	HEX
	Chu kỳ ngưỡng (C_T)	Chu kỳ ngưỡng (C_T)		Chu kỳ ngưỡng (C_T)	Chu kỳ ngưỡng (C_T)
100/ 100	32,86 ^a ± 0,26	28,36 ^a ± 0,20	300/ 400	31,40 ^{cdefgh} ± 0,34	25,86 ^{kim} ± 0,15
100/ 200	31,85 ^{bcd} ± 0,26	28,01 ^{ab} ± 0,07	300/ 500	30,65 ^{gh} ± 0,53	26,56 ^{ghij} ± 0,15
100/ 300	31,41 ^{cdefgh} ± 0,15	27,79 ^{abc} ± 0,15	400/ 100	32,74 ^{ab} ± 0,25	27,56 ^{bcd} ± 0,22
100/ 400	30,97 ^{defgh} ± 0,38	27,47 ^{bcd} ± 0,19	400/ 200	32,23 ^{abc} ± 0,24	26,86 ^{efgh} ± 0,28
100/ 500	30,54 ^{gh} ± 0,07	27,33 ^{cde} ± 0,13	400/ 300	31,69 ^{cde} ± 0,26	26,31 ^{ijkl} ± 0,12
200/ 100	32,27 ^{abc} ± 0,75	27,47 ^{bcd} ± 0,33	400/ 400	31,02 ^{defgh} ± 0,04	26,17 ^{ijklm} ± 0,18
200/ 200	31,73 ^{cde} ± 0,12	26,80 ^{efgh} ± 0,28	400/ 500	30,82 ^{efgh} ± 0,13	25,84 ^{lm} ± 0,16
200/ 300	31,43 ^{cdefg} ± 0,16	26,64 ^{fghi} ± 0,09	500/ 100	31,64 ^{cdef} ± 0,08	27,30 ^{cde} ± 0,18
200/ 400	31,46 ^{cdefg} ± 0,36	26,43 ^{hijk} ± 0,24	500/ 200	31,24 ^{defgh} ± 0,54	27,20 ^{def} ± 0,13
200/ 500	30,95 ^{defgh} ± 0,37	26,21 ^{ijkl} ± 0,20	500/ 300	30,93 ^{defgh} ± 0,03	26,61 ^{ghi} ± 0,05
300/ 100	32,81 ^{ab} ± 0,18	27,03 ^{defg} ± 0,04	500/ 400	30,70 ^{gh} ± 0,21	26,16 ^{ijklm} ± 0,55
300/ 200	31,39 ^{cdefgh} ± 0,22	26,12 ^{ijklm} ± 0,13	500/ 500	30,58 ^{gh} ± 0,25	26,02 ^{klm} ± 0,19
300/ 300	30,45^h ± 0,36	25,60^m ± 0,13			

Bảng 3. Kết quả tối ưu nồng độ probe CMNV-Taq/ β -actin trên DNA plasmid 10^3 copies và gen chứng nội β -actin

Nồng độ probe CMNV-Taq/ β -actin	FAM	HEX	Nồng độ probe CMNV-Taq/ β -actin	FAM	HEX
	Chu kỳ ngưỡng (C_T)	Chu kỳ ngưỡng (C_T)		Chu kỳ ngưỡng (C_T)	Chu kỳ ngưỡng (C_T)
100/ 50	32,31 ^a ± 0,19	27,70 ^a ± 0,19	300/ 200	29,29^l ± 0,33	25,35^k ± 0,20
100/ 100	32,03 ^{abc} ± 0,12	27,09 ^{bcd} ± 0,20	300/ 250	29,52 ^{kl} ± 0,23	25,44 ^k ± 0,17
100/ 150	31,83 ^{abc} ± 0,22	26,87 ^{cde} ± 0,10	400/ 50	31,32 ^{cdef} ± 0,18	26,93 ^{cde} ± 0,09

100/ 200	31,59 ^{abcd} ± 0,28	26,62 ^{defg} ± 0,10	400/ 100	30,89 ^{defg} ± 0,22	26,55 ^{defgh} ± 0,12
100/ 250	30,75 ^{efg} ± 0,24	26,31 ^{fghi} ± 0,09	400/ 150	30,31 ^{ghij} ± 0,18	26,19 ^{ghi} ± 0,15
200/ 50	32,12 ^{ab} ± 0,03	27,49 ^{ab} ± 0,14	400/ 200	29,86 ^{hijkl} ± 0,15	25,87 ^{ijk} ± 0,13
200/ 100	31,74 ^{abc} ± 0,15	27,00 ^{bcd} ± 0,12	400/ 250	29,75 ^{ijkl} ± 0,13	25,60 ^{jk} ± 0,04
200/ 150	30,66 ^{efg} ± 0,81	26,75 ^{def} ± 0,22	500/ 50	32,30 ^a ± 0,23	27,85 ^a ± 0,46
200/ 200	30,56 ^{fgh} ± 0,19	26,40 ^{efghi} ± 0,12	500/ 100	31,38 ^{abc} ± 0,17	27,40 ^{abc} ± 0,17
200/ 250	30,26 ^{ghijk} ± 0,22	26,23 ^{fghi} ± 0,18	500/ 150	30,67 ^{bode} ± 0,11	26,88 ^{cde} ± 0,13
300/ 50	30,51 ^{ghi} ± 0,27	26,41 ^{efghi} ± 0,17	500/ 200	30,22 ^{efg} ± 0,03	26,62 ^{defgh} ± 0,13
300/ 100	30,17 ^{ghijk} ± 0,11	26,30 ^{fghi} ± 0,17	500/ 250	30,22 ^{ghijk} ± 0,03	26,08 ^{hij} ± 0,07
300/ 150	29,70 ^{ikl} ± 0,12	25,65 ^{jk} ± 0,21			

Bảng 4. Kết quả khảo sát nhiệt độ CMNV-Taq/ β -actin trên DNA plasmid 10^3 copies và gen chứng nội β -actin

Nhiệt độ gắn mồi (°C)	Chu kỳ ngưỡng FAM (C _T)	Chu kỳ ngưỡng HEX (C _T)
55,0	31,59 ^a ± 0,13	27,12 ^a ± 0,14
57,5	30,78 ^{bc} ± 0,07	27,02 ^a ± 0,27
60,0	29,68^c ± 0,04	26,91^a ± 0,23
62,5	30,76 ^{bc} ± 0,19	27,01 ^a ± 0,26
65,0	31,56 ^{ab} ± 0,28	27, 20 ^a ± 0,12

Nhiệt độ lai là một chỉ tiêu quan trọng ảnh hưởng lớn đến kết quả của phản ứng qPCR. Nhiệt độ lai quá cao hoặc quá thấp đều ảnh hưởng không tốt đến kết quả phản ứng qPCR. Nếu nhiệt độ lai quá thấp so với nhiệt độ biến tính của mồi và probe sử dụng thì dễ tạo ra các sản phẩm ký sinh không mong muốn. Nếu nhiệt độ lai quá cao sẽ cản trở sự bắt cặp của mồi và probe vào DNA bản mẫu thì hiệu quả nhân bản sẽ không cao. Gradient nhiệt độ khảo sát được xác định bằng cách lấy nhiệt độ trung bình giữa mồi có nhiệt độ thấp nhất và mồi có nhiệt độ cao nhất ± 5 ($T_a = (T_{m1} + T_{m2})/2 \pm 5$). Khoảng gradient nhiệt độ khảo sát từ 55°C đến 65°C. Kết quả ở Bảng 4 cho thấy nhiệt độ lai 60°C là nhiệt độ thích hợp cho các cặp mồi và probe gắn vào trình tự gen *RdRp* và gen chứng nội β -actin trên tôm.

Nồng độ cDNA cao có thể dẫn đến khuếch đại sản phẩm không đặc hiệu và ức chế phản ứng PCR. Tiến hành khảo sát các nồng độ là 1, 20, 40, 60, 80 và 100 bản sao/ phản ứng với thành phần phản ứng và chu trình nhiệt như trên với nồng độ mồi và probe đã tối ưu. Trong đó, hàm lượng cDNA plasmid trong phản ứng từ 20 - 100 bản sao/ phản ứng là tối ưu nhất cho phản ứng PCR vì cường độ tín hiệu huỳnh quang đạt giá trị cao nhất.

Bảng 5. Khảo sát ảnh hưởng nồng độ cDNA plasmid đến phản ứng duplex qPCR phát hiện trình tự *RdRp* và β -actin

Hàm lượng DNA (bản sao/ phản ứng)	CMNV-RdRp	β -actin
	C _T FAM	C _T HEX
1	No C _T	25,32
20	37,56	24,98
40	35,98	25,19
60	34,60	25,21
80	33,73	25,28
100	32,64	25,18

Để chủ động trong phát triển quy trình duplex RT-qPCR phát hiện virus *CMNV* dựa trên trình tự gen *RdRp* và gen chứng nội β -actin, khảo sát thêm 2 loại master mix tự pha OneTaq® Standard Reaction Buffer (PCR Mix 1) và AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase with Buffer II and MgCl₂ (PCR Mix 2) đối chiếu với master mix đang sử dụng trong nghiên cứu. Qua đó, 2 master mix đều có thể được sử dụng để làm master mix cho phương pháp duplex RT-qPCR nhưng cần phải khảo sát và tối ưu thêm.

Độ tin cậy của thí nghiệm được thể hiện qua nhiều yếu tố trong đó độ lặp lại là một yếu tố quan trọng. Để khảo sát độ biến thiên nội phản ứng của quy trình phát hiện *CMNV* bằng duplex RT-qPCR, được thực hiện trên chứng dương *CMNV* với nồng độ từ 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , mỗi mẫu lặp lại 10 lần trong cùng một đợt thí nghiệm. Trên nguyên tắc một quy trình duplex RT-qPCR càng có các độ biến thiên nội phản ứng và liên phản ứng càng nhỏ thì

kết quả thu nhận càng đáng tin cậy. Theo Bustin (2002), C_T của phản ứng duplex RT-qPCR sử dụng Taqman probe nên nhỏ hơn 2%. Kết quả cho thấy độ biến thiên nội phản ứng của quy trình duplex RT-qPCR CMNV ở các nồng độ DNA có %CV từ 0,98% đến 1,94% và độ biến thiên liên phản ứng thấp nhất là 0,70%, còn hệ số biến thiên liên phản ứng cao nhất 1,91%.

Xác định các thông số kỹ thuật của quy trình

Độ chọn lọc của phương pháp duplex RT-qPCR thực hiện trên 10 mẫu tôm nhiễm CMNV và 5 mẫu nhiễm các bệnh khác trên tôm. Cho thấy phương pháp duplex RT-qPCR xây dựng phát hiện virus CMNV gây bệnh trên tôm xây dựng chỉ phát hiện virus CMNV, không phát hiện các tác nhân khác gây bệnh trên tôm.

Giới hạn phát hiện (LOD_{50}) là giá trị 1 nồng độ nhỏ nhất hay lượng chất phân tích nhỏ nhất trong mẫu thử mà phương pháp có thể phát hiện được với tỷ lệ 50%. LOD_{50} của một quy trình phân tích có ý nghĩa quan trọng trong việc định hướng sử dụng. Các cDNA ly trích từ mẫu tôm trắng này sẽ được nhiễm chủ động ở nồng độ 2-100 copy/ μ l. LOD_{50} trung bình của phương pháp duplex RT-qPCR phát hiện CMNV nhiễm trên tôm trên vật liệu di truyền của CMNV với nồng độ cDNA plasmid là 5 copy/phản ứng, với độ tin cậy 95%, giá trị LOD_{50} của phương pháp dao động trong khoảng 5-10 copy/ phản ứng trên cDNA plasmid. Và LOD_{50} trung bình của phương pháp duplex RT-qPCR phát hiện CMNV nhiễm trên tôm trên mẫu tôm ly trích với nồng độ cDNA ly trích là 12 pg/phản ứng với độ tin cậy 95%, giá trị LOD_{50} của phương pháp dao động trong khoảng 12 pg/phản ứng trên cDNA ly trích. Theo nghiên cứu Li và đồng tác giả (2018), đã định lượng virus CMNV dựa trên trình tự gen đặc hiệu RdRp bằng phương pháp RT-qPCR. Kết quả phương pháp phát hiện nồng độ thấp nhất của CMNV là 9,6 pg từ RNA tổng số ly trích trên mẫu tôm nhiễm CMNV và 5,7 bản sao của DNA plasmid. Từ đó, kết quả nghiên cứu quy trình đang xây dựng và nghiên cứu của Li và đồng tác giả (2018) là tương đương nhau.

KẾT LUẬN

Đã thiết kế cặp mồi và probe hoạt động hiệu quả và đặc hiệu phát hiện virus *Covert Mortality Nodavirus*. Quy trình duplex RT-qPCR phát hiện virus CMNV trên tôm đã được tối ưu hóa trên bộ hóa chất 2X PerfeCTa[®] qPCR FastMix[®] II, Low ROX[™] với tỷ lệ nồng độ mồi (RdRp/ β -actin) là 300nM/300nM, nồng độ probe RdRp/ β -actin tương ứng 300nM/200nM. Với chu trình nhiệt là 95°C trong 2 phút; 40 chu kỳ 95°C trong 5 giây; 60°C trong 30 giây. Độ biến thiên nội phản ứng của quy trình ở các nồng độ DNA có %CV từ 0,98% đến 1,94% và độ biến thiên liên phản ứng thấp nhất là 0,70%, còn hệ số biến thiên liên phản ứng cao nhất 1,91%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Burd EM (2010). Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 23(3): 550-576.
- Bustin S (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology*, 29: 23-39.
- Li XP, Wan XY, Xu TT (2018). Development and validation of a TaqMan RT-qPCR for the detection of *covert mortality nodavirus* (CMNV). *Journal of virological methods*, 262: 65-71.
- Phạm Hùng Vân (2011). PCR và Real-time PCR. Các vấn đề cơ bản và các áp dụng thường gặp. Nhà xuất bản Y học.
- Zhang Q, Liu Q, Liu S (2014). A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp. *Journal of General Virology*, 95(12): 2700-2709.
- Zhang Q, Liu S, Yang H (2017). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid and quantitative assay of *covert mortality nodavirus* in shrimp. *Journal of invertebrate pathology*, 150: 130-135.
- Zhang Q, Xu T, Wan X (2017). Prevalence and distribution of *covert mortality nodavirus* (CMNV) in cultured crustacean. *Virus Research*, 233: 113-119.

DEVELOPMENT OF A DUPLEX RT-qPCR FOR THE DETECTION OF CMNV (*Covert Mortality Nodavirus*) IN SHRIMP

Do Thi Nhu Thao^{*}, Nguyen Pham Truc Phuong, Luong Thi Ngoc Han, Nguyen Tran Duc Duy, Nguyen Thi Loan, Hoang Dac Hiet

Research and Development Center for High Technology Agriculture

SUMMARY

Among the diseases caused by viruses in shrimp, the disease with a high death rate and rapid spread is the disease caused by the CMNV virus (*Covert Mortality Nodavirus*), which causes mysterious shrimp mortality syndrome. CMNV has the ability to spread quickly to the surrounding area and predicts the risk of a large-scale outbreak if timely prevention measures are not taken. Research on building a duplex RT-qPCR process to detect CMNV virus causing disease in white leg shrimp. The duplex RT-qPCR method using Taqman probe was developed and optimized with the RdRp/ β -actin primer concentration ratio of 300 nM/300 nM, respectively; Corresponding probe concentration of 300 nM/200 nM for the RdRp gene target sequence was built on the PerfeCTa® qPCR FastMix® II, Low ROX™ chemical kit. With a thermal cycle of 95°C for 2 minutes; 40 cycles of 95°C for 5 seconds; 60°C for 30 seconds. Determine the technical parameters of the duplex RT-qPCR process to detect CMNV virus causing disease in white shrimp such as selectivity (100%), limit of detection (LOD₅₀) with a concentration of 5-10 copies/ Reaction on plasmid DNA and concentration of 12pg/reaction on extracted cDNA. The intra-reaction variability of the duplex RT-qPCR CMNV process at DNA concentrations with %CV from 0.98% to 1.94% and the lowest inter-reaction variability is 0.70%, while the coefficient The highest inter-reaction variation was 1.91%.

Keywords: β -actin, CMNV (*Covert Mortality Nodavirus*), duplex RT-qPCR, RdRp gene, shrimp.

^{*} Author for correspondence: Tel: +84-903109420; Email: dthao97721@gmail.com