

PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH LƯỢNG *Tomato necrotic ringspot virus* GÂY HẠI TRÊN CÀ CHUA (*Solanum lycopersicum*) DỰA TRÊN TRÌNH TỰ GEN NUCLEOCAPSID PROTEIN

Huỳnh Nguyễn Minh Nghĩa, Nguyễn Thị Kim Thoa, Nguyễn Xuân Dũng*

Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Tomato necrotic ringspot virus (TNRV) là virus gây ra bệnh đốm vòng trên cà chua mới được phát hiện gần đây. Các nghiên cứu liên quan đến việc phát hiện virus này hiện vẫn còn hạn chế về số lượng và chủ yếu tập trung ở mức độ định tính. Bài báo này trình bày kết quả phát hiện và định lượng TNRV bằng kỹ thuật real-time RT-PCR. Trong đó, trình tự gen nucleocapsid protein của virus được sử dụng cho thiết kế mồi và thiết lập phản ứng real-time RT-PCR. Kết quả cho thấy phản ứng real-time RT-PCR có khả năng khuếch đại và định lượng virus thông qua phân đoạn gen có kích thước 101 bp và tương đồng 98% với trình tự gen đã được công bố của TNRV. Phản ứng có giới hạn định lượng đạt mức 1000 bản sao/ μ L dựa trên đường chuẩn ($y = -3,22x + 38,87$) có hệ số tương quan $R^2 = 0,99$. Kết quả áp dụng phản ứng đã thiết lập cho việc phát hiện và định lượng virus TNRV trong 10 mẫu cà chua thu thập từ đồng ruộng đã xác định được 02 mẫu có sự hiện diện của virus với giá trị định lượng cao nhất đạt mức $2,48 \times 10^8$ số bản sao/ μ L. Kết quả này cho thấy phản ứng real-time RT-PCR được thiết lập trong nghiên cứu này có thể được áp dụng vào thực tế để hỗ trợ cho công tác quản lý virus gây bệnh trên cà chua.

Từ khóa: Bệnh virus, cà chua, nucleocapsid protein, *Tomato necrotic ringspot virus*, real-time PCR.

MỞ ĐẦU

Cà chua (*Solanum lycopersicum* L.) là một loại cây trồng có giá trị kinh tế đang được trồng phổ biến tại Việt Nam. Diện tích trồng cà chua hằng năm đạt 15.000-17.000 ha với năng suất ước tính khoảng 15 - 17 tấn/ha và hơn 30 tấn/ha đối với một số vùng chuyên canh (Tuan, Mao, 2015). Tuy nhiên, cà chua lại khá nhạy cảm với các loại bệnh do nấm, vi khuẩn và virus gây ra (Jolly, 2016). *Tomato necrotic ringspot virus* (TNRV), là virus thuộc nhóm *Tospovirus*, gây ra bệnh đốm vòng trên cây cà chua, được phát hiện lần đầu tiên tại Thái Lan (Seepiban *et al.*, 2011; Chiemsombat *et al.*, 2010). TNRV được phát hiện tại Việt Nam vào năm 2021 (Hoàng Việt Hậu *et al.*, 2021) và hiện đang tiếp tục gây hại trên nhiều khu vực trồng cà chua. Phương pháp phát hiện TNRV đang được sử dụng hiện nay chủ yếu là định tính thông qua ELISA, RT-PCR hoặc ELISA-RT-PCR (Channarong Seepiban *et al.*, 2011; Hoàng Việt Hậu *et al.*, 2021; Saengsoon Charoenvilaisiri *et al.*, 2014), do đó không thể xác định được lượng virus có trong mẫu. Trái lại, real-time RT-PCR là phương pháp có thể đồng thời phát hiện và định lượng virus với độ nhạy cao (Jeong *et al.*, 2014) và đã được sử dụng trong nghiên cứu kiểm soát virus gây bệnh trên cây trồng (Nageswara-Rao *et al.*, 2013). Việc áp dụng real-time RT-PCR để phát hiện và định lượng TNRV sẽ giúp nâng cao hiệu quả kiểm soát virus này. Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích thiết lập quy trình phát hiện và định lượng TNRV dựa trên trình tự gen nucleocapsid protein bằng phương pháp real-time RT-PCR.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thu thập nguồn mẫu nhiễm virus

Mẫu lá được thu thập dựa trên các triệu chứng đặc trưng của bệnh đốm vòng cà chua (lá xoắn, nhăn nheo, có đốm xanh đậm đen xen với xanh vàng, mặt dưới lá có các đốm đen hoại tử) (Seepiban *et al.*, 2011; Chiemsombat *et al.*, 2010) tại các vườn trồng cà chua ở Lâm Đồng. Sau khi thu thập, mẫu được rửa sạch với nước, bảo quản ở nhiệt độ -80°C trong tủ âm sâu (Sanyo, Nhật Bản).

Chủng vi khuẩn NEB 10-beta Competent *E. coli* được sử dụng cho thí nghiệm nhân dòng gen (kèm theo bộ Kit NEB PCR Cloning).

Thiết kế mồi phát hiện virus

Mồi phát hiện virus được thiết kế dựa trên trình tự gen của virus được công bố trên ngân hàng gen GenBank (FJ946835, HM113532, FN995637, FN806775, FJ947153, KY563368) sau khi tiến hành so sánh để chọn lọc vùng bảo tồn. Sau đó, khả năng bắt cặp của mồi với các trình tự gen của các virus khác được kiểm tra bằng phần mềm Blast NCBI.

Ly trích RNA virus và khuếch đại gen

RNA được ly trích từ mẫu lá cà chua (0,1 g) nhiễm virus bằng bộ Kit GeneJET Plant RNA purification mini (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. RNA thu được sau ly trích sẽ được pha loãng đến nồng độ 100 ng/μL để sử dụng cho khuếch đại trình tự gen nucleocapsid protein. Phản ứng RT-PCR khuếch đại gen (25 μ) gồm có 1X DreamTaq Green PCR Master Mix, 2 U/μL RevertAid Reverse Transcriptase, 0,4 U/μL RiboLock RNase Inhibitor, 0,4 μM mỗi loại mỗi xuôi và mỗi ngược, và 4 ng/μL RNA mẫu. Chương trình RT-PCR bao gồm 1 chu kỳ ở 50°C/15 phút; 1 chu kỳ ở 95°C/2 phút; 40 chu kỳ ở 95°C/30 giây, T_a/30 giây, 72°C/60 giây và 1 chu kỳ ở 72°C/5 phút, với T_a là nhiệt độ bắt cặp mỗi được thiết lập thấp hơn nhiệt độ nóng chảy 3°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose (1,5%) trong 30 phút/100V, sau đó nhuộm với Ethidium Bromide (0,4 μg/mL) trong 30 phút và quan sát trên máy chụp gel (Geldoc, Biorad, Hoa Kỳ).

Dòng hóa và kiểm tra trình tự gen

Phân đoạn gen mục tiêu được gắn vào vector pMiniTTM 2.0 (sử dụng Kit NEB[®] PCR Cloning), sau đó biến nạp vào vi khuẩn NEB 10-beta Competent *E. coli* bằng phương pháp sốc nhiệt. Vi khuẩn sau biến nạp được sàng lọc trên môi trường LB rắn bổ sung 100 mg/L ampicillin, ở 37°C trong 24 giờ trước khi kiểm tra bằng phản ứng PCR khuẩn lạc (sử dụng mỗi Cloning Analysis Primer, F: 5'-ACCTGCCAACCAAAGCGAGAAC-3', R: 5'-TCAGGGTTATTGTCTCATGAGCG-3'). Các dòng vi khuẩn thu nhận sau biến nạp được tách plasmid (sử dụng Kit DNA-SpinTM Plasmid DNA Purification, iNtRON, Hàn Quốc) và gửi mẫu giải trình tự.

Chuẩn bị mẫu DNA plasmid

Plasmid mang đoạn gen mục tiêu được sử dụng làm mẫu chuẩn xác định hàm lượng DNA và tính số lượng bản sao gen theo công thức (Staroscik, 2018):

$$\text{Số bản sao gen} = \frac{\text{Khối lượng DNA} \times 6,022 \times 10^{23}}{\text{Chiều dài đoạn gen} \times 1 \times 10^9 \times 650}$$

Trong đó: Đơn vị khối lượng DNA: ng, chiều dài đoạn gen: bp.

DNA plasmid sau khi xác định số bản sao sẽ được pha loãng thành các mẫu có nồng độ từ 10⁶ đến 10⁰ bản sao/μL theo hệ số bậc 10.

Thiết lập phản ứng và dựng đường chuẩn cho real-time PCR

Phản ứng real-time RT-PCR khuếch đại trình tự gen mục tiêu trong mẫu RNA được thiết lập với thể tích 25 μL, bao gồm 1X Maxiam SYBR Green/Rox qPCR Master Mix, 2 U/μL RevertAid Reverse Transcriptase, 4 U/μL RiboLock RNase Inhibitor, 0,4 μM mỗi loại mỗi xuôi và mỗi ngược và 0,4 ng/μL RNA mẫu. Phản ứng được thực hiện với 40 chu kỳ khuếch đại (tổng hợp cDNA: [50°C/15 phút]; khuếch đại cDNA: [95°C/2 phút]; 40 x [95°C/30 giây, 54°C/30 giây, 72°C/60 giây]; [95°C/10 giây, 65°C 1 phút, 97°C 1 giây]; [37°C 30 giây]) và phân tích kết quả trên máy real-time PCR (LightCycler[®] 96, Roche).

Đường chuẩn được xây dựng dựa trên giá trị biến thiên chu kỳ ngưỡng (ΔCt) và log (bản sao/μL) tương ứng của mẫu thu được từ phản ứng real-time PCR (có thành phần và chương trình nhiệt tương tự phản ứng khuếch đại cDNA của phản ứng real-time RT-PCR) khuếch đại mẫu các mẫu DNA plasmid có nồng độ từ 10¹ đến 10⁶ bản sao/μL.

Tạo mẫu chuẩn RNA

Mẫu RNA ly trích từ lá cà chua nhiễm bệnh (được xác định trước đó bằng RT-PCR) được định lượng bằng phản ứng real-time RT-PCR để xác định nồng độ virus có trong mẫu, sau đó pha loãng thành các mẫu có nồng độ từ 10⁵ đến 10⁰ bản sao/μL theo hệ số bậc 10.

Xác định ngưỡng phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) và xác định khả năng định lượng thực tế của phản ứng real-time RT-PCR

LOD được xác định bằng cách lặp lại 3 lần phản ứng real-time RT-PCR trên các mẫu RNA có nồng độ từ 10⁰ đến 10⁵ bản sao/μL. Xác định nồng độ thấp nhất mà phản ứng có thể phát hiện được và lặp lại 10 lần phản ứng real-time RT-PCR cho trường hợp này. LOD sẽ được xác lập nếu tất cả 10 lần lặp lại đều cho kết quả dương tính. Nếu số lần cho kết quả dương tính nhỏ hơn 10, thực hiện lại việc xác định LOD với mẫu có nồng độ cao hơn liền kề.

LOQ được xác định trên mẫu có nồng độ biết trước (bao gồm một mẫu ở mức LOD và hai mẫu cao hơn LOD) bằng cách lặp lại 10 lần phản ứng real-time RT-PCR định lượng. Dựa vào kết quả định lượng, tính độ lệch chuẩn (SD) và độ lệch chuẩn tương đối (RSD) theo công thức (European Network of GMO laboratories, 2011):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum Xi^2 - \frac{(\sum Xi)^2}{n}}{n - 1}} \text{ và } RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

Với $\sum Xi^2$: tổng bình phương các giá trị đo được tại một giá trị số bản sao cho trước; $\sum Xi$: tổng các giá trị đo được tại một nồng độ; n : số lần lặp lại tại một nồng độ; X : giá trị trung bình các lần đo được tại một nồng độ; $\bar{X} = \frac{\sum Xi}{n}$.

CÔNG NGHỆ GEN

Nồng độ mẫu thấp nhất mà tại đó phản ứng cho kết quả dương tính và có giá trị RSD ≤ 25% được xác định là LOQ.

Khả năng định lượng thực tế của phản ứng real-time RT-PCR được đánh giá thông qua việc định lượng virus TRNV trên mẫu thu thập.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết kế mồi

Kết quả so sánh các trình tự gen nucleocapsis protein đã được công bố của virus *TNRV* cho thấy vùng trình tự từ vị trí nucleotide 258 đến 341 (theo trình tự FN995637) có sự tương đồng giữa các trình tự lớn hơn so với các vùng còn lại (Hình 1). Do đó, vùng trình tự này đã được chọn để thiết kế mồi.

F3946835.1	CACTTTCACTATCTGATATAAATGATCCTGTAATGTAATCTTTACAGTCTTACTACTCTCT	249
HM113532.1	-----CTACAGTCTTACTACTCTCT	79
FN995637.1	-----	27
FN806775.1	-----	27
F3947153.1	-----AACGAGAAAATCAAGGAATTGCTA-	51
KY563368.1	-----AACGAGAAAATCAAGGAATTGCTA-	51
F3946835.1	CTCCTAGTTGGCTTCTAGTACTCACACTATTGCTCCAAAATCATCAATGACTGGCTTG	300
HM113532.1	CTCCTAGTTGGCTTCTAGTACTCACACTATTGCTCCAAAATCATCAATGACTGGCTTG	79
FN995637.1	-----AACGAGAAAATCAAGGAATTGCTA-	51
FN806775.1	-----AACGAGAAAATCAAGGAATTGCTA-	51
F3947153.1	-----AACGAGAAAATCAAGGAATTGCTA-	51
KY563368.1	-----AACGAGAAAATCAAGGAATTGCTA-	51
F3946835.1	GATCCAAATGCTTTCTCAAGATGAGCAATCTGTTGAGTATTTCTCAAGGATATTGAG	360
HM113532.1	GATCCAAATGCTTTCTCAAGATGAGCAATCTGTTGAGTATTTCTCAAGGATATTGAG	139
FN995637.1	-----GCTGGAGGAGGAGCAGA-----CATTGAAATAGAGCTTGAT	87
FN806775.1	-----GCTGGAGGAGGAGCAGA-----CATTGAAATAGAGCTTGAT	87
F3947153.1	-----GCTGGAGGAGGAGCAGA-----CATTGAAATAGAGCTTGAT	87
KY563368.1	-----GCTGGAGGAGGAGCAGA-----CATTGAAATAGAGCTTGAT	87
F3946835.1	CTAGCTGTTCCAGGTGAGCTAGTCTTCAAATAGCTTTGAGATTCGAACAAATTTCTC	420
HM113532.1	CTAGCTGTTCCAGGTGAGCTAGTCTTCAAATAGCTTTGAGATTCGAACAAATTTCTC	199
FN995637.1	GAAGCTACACAGGGTTCAGCTTTCTAAATCTATGATGAAAACAACA-----GG	139
FN806775.1	GAAGCTACACAGGGTTCAGCTTTCTAAATCTATGATGAAAACAACA-----GG	139
F3947153.1	GAAGCTACACAGGGTTCAGCTTTCTAAATCTATGATGAAAACAACA-----GG	139
KY563368.1	GAAGCTACACAGGGTTCAGCTTTCTAAATCTATGATGAAAACAACA-----GG	139
F3946835.1	AAATCACCGGTAATCAACTTGAGCAGCATCACACT-----	459
HM113532.1	AAATCACCGGTAATCAACTTGAGCAGCATCACACT-----	238
FN995637.1	ACATCTTCGGAAAATTTACATCAACAATGGAATACTATAAAGAGTAGAAGCAGA	199
FN806775.1	ACATCTTCGGAAAATTTACATCAACAATGGAATACTATAAAGAGTAGAAGCAGA	199
F3947153.1	ACATCTTCGGAAAATTTACATCAACAATGGAATACTATAAAGAGTAGAAGCAGA	199
KY563368.1	ACATCTTCGGAAAATTTACATCAACAATGGAATACTATAAAGAGTAGAAGCAGA	199
F3946835.1	--CGAGCAACTTACA-----TAGCTGTTCATATGAGAAAAGTTTTTATCCGAGA	510
HM113532.1	--CGAGCAACTTACA-----TAGCTGTTCATATGAGAAAAGTTTTTATCCGAGA	289
FN995637.1	TATTTGAGCTTGCAGAACAAATCAATTCGCTTTTGGGAAAGCAA--ATAGCACAAA	257
FN806775.1	TATTTGAGCTTGCAGAACAAATCAATTCGCTTTTGGGAAAGCAA--ATAGCACAAA	257
F3947153.1	TATTTGAGCTTGCAGAACAAATCAATTCGCTTTTGGGAAAGCAA--ATAGCACAAA	257
KY563368.1	TATTTGAGCTTGCAGAACAAATCAATTCGCTTTTGGGAAAGCAA--ATAGCACAAA	257
F3946835.1	TTCTGTTTTTGACAT-TCTGAAATATGCAAGAGAGAAAGCTATAGGTGCCATTGACGG	569
HM113532.1	TTCTGTTTTTGACAT-TCTGAAATATGCAAGAGAGAAAGCTATAGGTGCCATTGACGG	348
FN995637.1	TTCTGACACTGCTGATGAAAAGACATGGACATTCAAGAGAACTGAAGCGCTCTAGAGT	317
FN806775.1	TTCTGACACTGCTGATGAAAAGACATGGACATTCAAGAGAACTGAAGCGCTCTAGAGT	317
F3947153.1	TTCTGACACTGCTGATGAAAAGACATGGACATTCAAGAGAACTGAAGCGCTCTAGAGT	317
KY563368.1	TTCTGACACTGCTGATGAAAAGACATGGACATTCAAGAGAACTGAAGCGCTCTAGAGT	317
F3946835.1	GAGACTGGCAATAAAGGCAAGGACCGCCGACACACAGCATCAGCTGGTTGCACAGGA	629
HM113532.1	GAGACTGGCAATAAAGGCAAGGACCGCCGACACACAGCATCAGCTGGTTGCACAGGA	488
FN995637.1	TCTCATGGCAAGATGGTTGAAGAATGCACAACCCAGAAACT-----	359
FN806775.1	TCTCATGGCAAGATGGTTGAAGAATGCACAACCCAGAAACT-----	359
F3947153.1	TCTCATGGCAAGATGGTTGAAGAATGCACAACCCAGAAACT-----	359
KY563368.1	TCTCATGGCAAGATGGTTGAAGAATGCACAACCCAGAAACT-----	359
F3946835.1	ATCAAAATGGGAGGTACATTCACCCGTAAGCAATAACCATAGGAAGTACATAAGTTT	689
HM113532.1	ATCAAAATGGGAGGTACATTCACCCGTAAGCAATAACCATAGGAAGTACATAAGTTT	468
FN995637.1	---CCAGCAAGATATGATTCAAAGCTTATGCTTCTTATGCTTCTTACGGGT	415
FN806775.1	---CCAGCAAGATATGATTCAAAGCTTATGCTTCTTATGCTTCTTACGGGT	415
F3947153.1	---CCAGCAAGATATGATTCAAAGCTTATGCTTCTTATGCTTCTTACGGGT	415
KY563368.1	---CCAGCAAGATATGATTCAAAGCTTATGCTTCTTATGCTTCTTACGGGT	415

Hình 1. Kết quả so sánh các trình tự gen nucleocapsis protein của *TNRV* đã được công bố trên ngân hàng gen NCBI

Mồi được thiết kế với chiều dài 21 đến 23 nucleotide, tỷ lệ %GC từ 42,86 đến 43,48%, nhiệt độ nóng chảy từ 58,05 đến 58,94°C (Bảng 1) và được dự đoán có khả năng phát hiện được các chủng virus khác nhau do được thiết kế trên vùng tương đồng giữa các trình tự đã công bố.

Bảng 1. Trình tự và các thông số cơ bản của mồi được thiết kế

Tên	Trình tự (5' - 3')	Độ dài	%GC	Tm (°C)	Sản phẩm (bp)
TNRV	TCTGACACTGCTGATGAAAAGAC	23	43,48	58,94	101
	AGTTTCTGGGTTGTCATTCT	21	42,86	58,05	

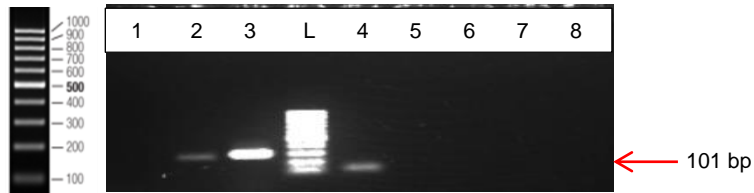
Kết quả phân tích khả năng bắt cặp với các trình tự gen virus công bố trên NCBI (Hình 2) cho thấy mồi chỉ có khả năng bắt cặp với các trình tự gen *TNRV* mà không hề bắt cặp với trình tự gen của các virus khác (Hình 2); điều này cho thấy mồi có tính đặc hiệu cao.

Khuếch đại phân đoạn gen mục tiêu của virus

Phản ứng RT-PCR đã khuếch đại được phân đoạn DNA xuất hiện ở vị trí khoảng 100-200 bp, phù hợp với sản phẩm dự kiến (101 bp) của cặp mồi TNRV (Hình 3). Kết quả này bước đầu cho thấy đã khuếch đại được phân đoạn gen phù hợp với phân đoạn gen mục tiêu. Tuy nhiên, không thể chắc chắn trình tự đã được khuếch đại có đúng là trình tự gen của virus hay không vì mồi vẫn có khả năng bắt cặp và khuếch đại một trình tự RNA khác có trong mẫu RNA. Vì vậy, phân đoạn DNA (kích thước khoảng trên 100 bp) này đã được dòng hóa và giải trình tự để kiểm tra.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Tomato necrotic ringspot virus isolate C11 non-structural movement protein and glycoprotein genes, complete cds	Tomato necrotic ringspot virus	36.2	36.2	100%	4.7	100.00%	4726	KY067015.1
Tomato necrotic ringspot virus isolate C24M non-structural movement protein and glycoprotein genes, complete cds	Tomato necrotic ringspot virus	36.2	36.2	100%	4.7	100.00%	4736	KY067014.1
Tomato necrotic ringspot virus isolate chili-CR1 segment M, complete sequence	Tomato necrotic ringspot virus	36.2	36.2	100%	4.7	100.00%	4724	MW256414.1
Tomato necrotic ringspot virus isolate T11 segment M, complete sequence	Tomato necrotic ringspot virus	36.2	36.2	100%	4.7	100.00%	4716	FJ947152.1
Tomato necrotic ring virus segment M, complete sequence	Tomato necrotic ring virus	34.2	34.2	94%	19	100.00%	4725	MF469049.1

Hình 2. Kết quả phân tích khả năng bắt cặp của mỗi với các trình tự gen virus bằng phần mềm BLAST NCBI

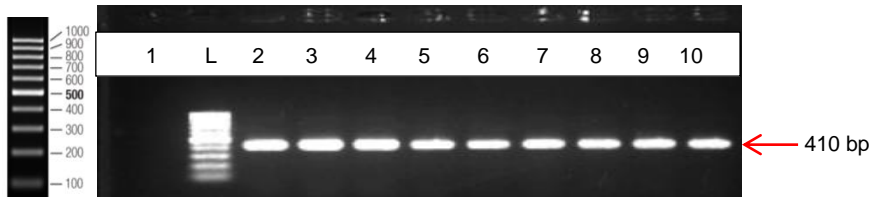


Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR khuếch đại gen virus TNRV

Ghi chú: 1. chứng âm, 2. chứng dương (khuếch đại RNA của CyMV, 257 bp), 3. kiểm chứng PCR (297 bp); L. thang DNA, 4-8. RNA ly trích từ lá cà chua

Tạo dòng và kiểm tra trình tự của đoạn gen khuếch đại

Do vector pMiniT 2.0 có mang gen kháng ampicilin nên sau khi được chèn phân đoạn gen mục tiêu và biến nạp vào vi khuẩn, các dòng vi khuẩn biến nạp sẽ phát triển và tạo khuẩn lạc trên môi trường chứa ampicilin. Kết quả biến nạp với sự xuất hiện của các khuẩn lạc trên môi trường LB bổ sung 100 mg/L ampicilin cho thấy quá trình biến nạp đã thành công. Tuy nhiên, để đảm bảo vector đã được chèn đúng phân đoạn gen mục tiêu, các khuẩn lạc tiếp tục được kiểm tra với cặp mồi Cloning Analysis. Kết quả kiểm tra đã thu được phân đoạn DNA có kích thước phù hợp với dự kiến (410 bp), bao gồm kích thước đoạn chèn (101 bp) và kích thước đoạn gen plasmid (309 bp). Điều này cho thấy các dòng vi khuẩn được kiểm tra có mang vector đã được chèn gen mục tiêu (Hình 4).



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra khuẩn lạc với cặp mồi pMiniT[™] 2.0

Ghi chú: L. Thang DNA, 1. Chứng âm, 2-4. Mẫu khuẩn lạc

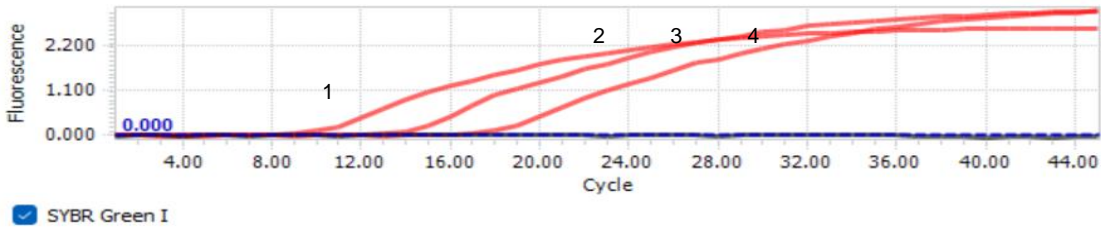
Kết quả giải trình tự và so sánh trên ngân hàng gen NCBI cho thấy đoạn gen thu được tương đồng 98% với đoạn gen tương ứng của TNRV đã được công bố (Hình 5); chứng tỏ đoạn gen đã khuếch đại được đúng là gen nucleocapsis protein của TNRV.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Tomato necrotic ringspot virus isolate P13 nucleocapsid protein (N) gene, complete cds	Tomato necrotic ringspot virus	176	176	100%	6e-40	98.02%	846	KY563368.1
Tomato necrotic ring virus segment S, complete sequence	Tomato necrotic ring virus	176	176	100%	6e-40	98.02%	3017	MF469050.1
Tomato necrotic ringspot virus isolate T1 NSs protein and nucleocapsid protein genes, complete cds	Tomato necrotic ringspot virus	176	176	100%	6e-40	98.02%	3016	KM887842.1
Tomato necrotic ringspot virus isolate 94 NSs protein and nucleocapsid protein genes, complete cds	Tomato necrotic ringspot virus	176	176	100%	6e-40	98.02%	3017	KM887841.1
Tomato necrotic ringspot virus isolate chili-CR segment S, complete sequence	Tomato necrotic ringspot virus	176	176	100%	6e-40	98.02%	3013	MW256415.1

Hình 5. Kết quả so sánh trình tự đoạn gen khuếch đại với các trình tự gen TNRV công bố trên ngân hàng Gen NCBI

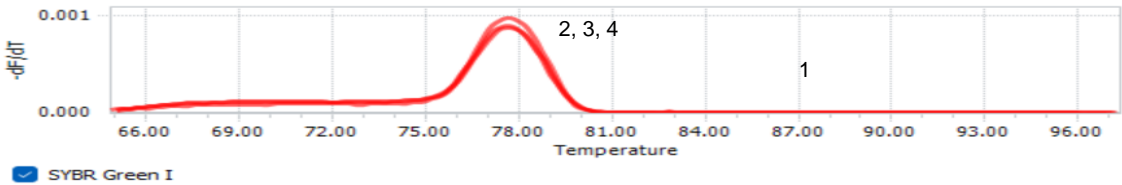
Thiết lập phản ứng real-time PCR

Phản ứng real-time PCR phát hiện *TNRV* cho sản phẩm khuếch đại được thể hiện bằng đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang. Trong đó, đường biểu diễn tín hiệu của các mẫu đều vượt trên tín hiệu nền (Hình 6), với chu kỳ ngưỡng lần lượt là 14,87; 18,69; 23,30. Sản phẩm khuếch đại có nhiệt độ nóng chảy (T_m) ở khoảng 77,5°C (Hình 7). Điều này cho thấy việc thử nghiệm phản ứng real-time PCR khuếch đại phân đoạn gen mục tiêu đã thực hiện thành công.



Hình 6. Biểu đồ khuếch đại phân đoạn gen mục tiêu dựa trên tín hiệu huỳnh quang

Ghi chú: Trục tung (Y) - Cường độ tín hiệu huỳnh quang, trục hoành (X) - số chu kỳ (Ct). 1. Chứng âm, 2, 3, 4. Mẫu RNA



Hình 7. Biểu đồ phân tích nhiệt độ nóng chảy phân đoạn gen mục tiêu

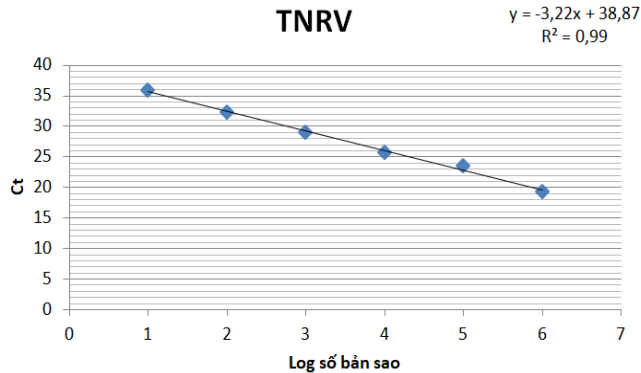
Ghi chú: 1. Chứng âm; 2, 3, 4. Mẫu RNA

Thiết lập đường chuẩn cho phản ứng real-time PCR

Đường chuẩn đã được thiết lập dựa trên giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct) thu được khi thực hiện phản ứng real-time PCR với các mẫu chuẩn có số lượng bản sao DNA thay đổi từ 10^6 - 10^1 bản sao/ μ L (Bảng 2). Phương trình đường chuẩn có dạng $y = -3,22x + 38,87$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,99$ (Hình 8).

Bảng 2. Giá trị Ct của phản ứng khuếch đại gen

Mẫu (bản sao/ μ L)	Log số bản sao	Ct
10^6	6	19,29
10^5	5	23,44
10^4	4	25,65
10^3	3	28,96
10^2	2	32,30
10^1	1	35,88



Hình 8. Biểu đồ đường chuẩn của phản ứng khuếch đại phân đoạn gen mục tiêu

Xác định giới hạn phát hiện của phản ứng real-time RT-PCR

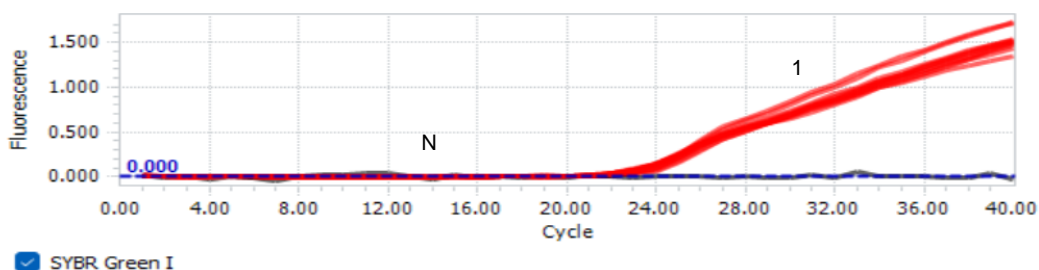
Với 6 mẫu RNA (có nồng độ từ 10^5 - 10^0 bản sao RNA/ μ L) được sử dụng, phản ứng real-time RT-PCR chỉ cho tín hiệu khuếch đại ở các mẫu có nồng độ từ 10^3 đến 10^5 bản sao/ μ L, với chu kỳ ngưỡng có giá trị thay đổi từ 26,23 đến 20,91 (Bảng 3). Điều này cho thấy mẫu có nồng độ thấp nhất có thể phát hiện là 10^3 bản sao/ μ L.

Kết quả thực hiện phản ứng lặp lại 10 lần với mẫu có nồng độ 10^3 bản sao/ μ L đều thu được tín hiệu khuếch đại ở tất cả các lần lặp lại với giá trị chu kỳ ngưỡng trung bình ở mức 26,23 (Hình 9).

Như vậy, ngưỡng phát hiện của phản ứng được xác định ở mức 10^3 bản sao/ μ L. Với ngưỡng phát hiện này, mặc dù có thể phát hiện được sự hiện diện của virus trong cây ở giai đoạn sớm nhưng vẫn còn thấp so với các kết quả phát hiện các virus khác trên cà chua như *Tomato black ring virus*, *Tomato yellow leaf curl virus* (Harper *et al.*, 2011; Huỳnh Nguyễn Minh Nghĩa *et al.*, 2020). Một thí nghiệm tối ưu hóa để nâng cao độ nhạy của phản ứng là cần thiết trong giai đoạn tiếp theo của nghiên cứu này.

Bảng 3. Kết quả phản ứng Real-time RT-PCR khuếch đại gen

Số bản sao/ μ L	Ct _{tb}
10^5	20,91 \pm 0,01
10^4	22,97 \pm 0,21
10^3	26,23 \pm 0,58
10^2	-
10^1	-
10^0	-



Hình 9. Biểu đồ tín hiệu huỳnh quang khuếch đại gen với mẫu có nồng độ 10^3 bản sao/ μ

Ghi chú: N. Chứng âm; 1. Mẫu 10^3 bản sao/ μ L

Xác định giới hạn định lượng của phản ứng real-time RT-PCR

Giới hạn định lượng của phản ứng real-time RT-PCR được phân tích với mẫu ở các nồng độ 10^3 , 10^4 , 10^5 bản sao RNA/ μ L. Kết quả cho thấy, giá trị RSD của phản ứng đạt mức thấp hơn 25% ở mẫu có nồng độ 10^3 bản sao/ μ L (Bảng 4). Như vậy, giới hạn định lượng của phản ứng có thể được xác định ở mức 10^3 bản sao/ μ L.

Bảng 4. Kết quả xác định giới hạn định lượng phản ứng real-time RT-PCR khuếch đại gen

Số bản sao lý thuyết	Số bản sao thực nghiệm	RSD (%)
10^3	$5,63 \times 10^3$	18,87
10^4	$1,29 \times 10^4$	10,05
10^5	$4,73 \times 10^5$	12,25

Định lượng virus trong mẫu cà chua

Virus có trong mẫu lá cà chua được định lượng dựa trên trên đường chuẩn đã thiết lập và chu kỳ ngưỡng trung bình của mẫu thử nghiệm (Bảng 5). Trong 10 mẫu được phân tích, chỉ có 02 mẫu LĐ-01 và LĐ-07 có sự hiện diện của virus TNRV với giá trị lần lượt là $8,52 \times 10^5$ và $2,48 \times 10^8$ số bản sao/ μ L.

Bảng 5. Giá trị Ct trung bình và định lượng tương ứng của mẫu lá cà chua thu thập

Kí hiệu mẫu	Ct trung bình	Giá trị định lượng (Số bản sao/ μ L)
LĐ-01	17,36	$8,52 \times 10^5$
LĐ-02	-	-
LĐ-03	-	-
LĐ-04	-	-
LĐ-05	-	-
LĐ-06	-	-
LĐ-07	9,61	$2,48 \times 10^8$
LĐ-08	-	-
LĐ-09	-	-
LĐ-10	-	-

KẾT LUẬN

Đã thiết lập được quy trình phát hiện virus *TNRV* gây bệnh trên cà chua bằng real-time RT-PCR với ngưỡng phát hiện và định lượng đều ở mức 10^3 bản sao/ μ L. Quy trình phát hiện được sử dụng để định lượng virus trong các mẫu cà chua với lượng virus dao động từ $8,52 \times 10^5$ đến $2,48 \times 10^8$ số bản sao/ μ L.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Tuan NM, Mao NT (2015). Effect of plant density on growth and yield of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) at Thai Nguyen, Vietnam. *Int J Plant Soil Sci*, 7(6): 357 - 361.
- Jolly B (2014). *Tomato yellow leaf curl virus*: A serious threat to tomato plants world wide. *J Plant Pathol Microbiol*, 7(4): 1-5.
- Chiemsombat P, Sharman M, Srivilai K, Campbell P, Persley D, Attathom S (2010). A new tospovirus species infecting *Solanum esculentum* and *Capsicum annuum* in Thailand. *Aus Plant Dis Note*, 5(1): 75 - 78.
- Seepiban C, Gajanandana O, Attathom T, Attathom S (2011). *Tomato necrotic ringspot virus*, a new tospovirus isolated in Thailand. *Arch Virol*, 156: 263 - 274.
- Hoang Viet Hau, Ho Minh Hien, Luu The Trung, Nguyen Khoa Tuong, Le Ngoc Trieu (2021). Khảo sát thành phần và tình trạng virus gây bệnh hại cà chua tại vùng trồng chính của tỉnh Lâm Đồng. *Tạp chí nông nghiệp và phát triển nông thôn*, 1: 59-66.
- Charoenvilaisiri S, Seepiban C, Bhunchoth A, Warin N, Luxananil P, Gajanandana O (2014). Development of a multiplex RT-PCR ELISA to identify four distinct species of tospovirus. *J Virol Meth*, 202: 54-63.
- Jeong JJ, Ju HJ, Noh J (2014). A review of detection methods for the plant viruses. *Res Plant Dis*, 20(3): 173-181.
- Nageswara-Rao M, Kwit C, Agarwal S, Patton MT, Skeen JA, Yuan JS, Stewart CN (2013). Sensitivity of a real-time PCR method for the detection of transgenes in a mixture of transgenic and non-transgenic seeds of papaya (*Carica papaya* L.). *BMC Biotechnol*, 13: 1-11.
- Staroscik A (2018). Calculator for determining the number of copies of a template. *URI Genomics & Sequencing Center*, accessed 26 January 2018. Available from: <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>.
- European Network of GMO laboratories (2011). Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods. *JRC Scientific and Technical reports*, EUR 24790 EN.
- Harper SJ, Delmiglio C, Ward LI, Clover GR (2011). Detection of *Tomato black ring virus* by real-time one-step RT-PCR. *J Virol Meth*, 171(1), 190-194.
- Huynh Nguyen Minh Nghia, Nguyen Vinh, Duong Hoa Xo, Nguyen Xuan Dung (2020). Phát hiện *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus* gây hại trên cây cà chua bằng real-time PCR. *Báo cáo toàn văn Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc*: 168-174.

DETECTION AND QUANTIFICATION OF *Tomato necrotic ringspot virus* AFFECTING TOMATO (*Solanum lycopersicum*) BASED ON NUCLEOCAPSID PROTEIN GENE

Huynh Nguyen Minh Nghia, Nguyen Thi Kim Thoa, Nguyen Xuan Dung*

Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

SUMMARY

Tomato necrotic ringspot virus (TNRV) is a recently discovered virus that causes ring spot disease in tomatoes. Research for detecting this virus is still limited in quantity and mainly focuses on the qualitative level. This article shows the results of detection and quantification of TNRV using real-time RT-PCR technology. The viral nucleocapsid protein gene sequence served as the basis for designing primers and conducting real-time RT-PCR. The results showed that the real-time RT-PCR is capable of amplifying and quantifying the virus based on a gene segment (101 bp) with 98% sequence homology to the published gene of TNRV. The reaction has a limit of quantification of 1000 copies/ μL based on the calibration curve ($y = -3.22x + 38.87$) with a correlation coefficient of $R^2 = 0.99$. The results of applying the established reaction for the detection and quantification TNV in ten collected samples of tomato from the field identified two samples with presence of the virus with highest quantification value reaching 2.48×10^8 copies/ μL . These findings suggest that the real-time RT-PCR reaction established in this study can be utilized in practice to aid in managing tomato viruses.

Keywords: Viral disease, nucleocapsid protein gene, *Tomato necrotic ringspot virus*, real-time PCR.

* Author for correspondence: Tel: 0903800438, Email: nxdung.snn@tphcm.gov.vn