

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIETNAM ACADEMY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

ISSN 1811-4989

TẠP CHÍ

CÔNG NGHỆ SINH HỌC

JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY

Tập (Volume) 15

Số (Number) 1

2017

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
TẠP CHÍ CÔNG NGHỆ SINH HỌC TẬP 15, SỐ 1 - 2017

=====

MỤC LỤC

CONTENTS

Lê Thị Kim Dung, Nguyễn Thị Kim Liên, Nguyễn Huy Hoàng, Nông Văn Hải. Vai trò của thụ thể AhR (Aryl hydrocarbon receptor) đối với ung thư ở người có nồng độ dioxin cao The role of Aryl hydrocarbon receptor (AhR) in carcinogenesis in people with high level of dioxin	1-13
Đỗ Hữu Chí, Nguyễn Thị Minh Phương, Bùi Thị Huyền, Nguyễn Tiến Dũng, Phạm Đình Minh, Đỗ Doãn Lợi, Nguyễn Thúy Huyền, Nguyễn Bích Nhi, Phan Văn Chi, Lê Thị Bích Thảo. Nồng độ matrix metalloproteinase-9 trong huyết thanh bệnh nhân hội chứng mạch vành cấp ở Việt Nam Level of serum matrix metalloproteinase-9 in patients with acute coronary syndrome in Vietnam	15-21
Lê Văn Phan, Nguyễn Thị Trung, Trương Nam Hải. Nghiên cứu tạo tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng gây ngưng kết hồng cầu nhóm máu B Study on creating the hybridoma for producing a monoclonal antibody that causes agglutination of the red blood cell B group	23-29
Lê Thanh Hòa, Đỗ Thị Roan, Nguyễn Thị Khuê, Đoàn Thị Thanh Hương, Nguyễn Thị Bích Nga. Xác định genotype, phả hệ và đặc điểm dịch tễ học phân tử của một số chủng virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV) tại Việt Nam Genotypic, phylogenetic and epidemiological characteristics of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains (PRRSV) in Vietnam	31-38
Nguyễn Thị Trung, Trương Nam Hải. Xác định loại globulin miễn dịch của kháng thể được sinh ra từ tế bào hybridoma A6G11C9 Isotyping antibodies produced from hybridoma A6G11C9	39-44
Trần Hoàng Dũng, Trương Nguyễn Thị Như Mai, Nguyễn Thành Công, Huỳnh Văn Hiếu. Trình tự hoàn chỉnh của genome ty thể mang haplotype hiếm E4 của chó lưng xoáy Phú Quốc Complete mitochondrial genome sequences of rare haplotype E4 from Phu Quoc ridgeback dog	45-54
Nguyễn Thị Giang An, Đồng Văn Quyền, Đinh Duy Kháng. Phân tích trình tự gen mã hóa polyhedrin của momodon baculovirus (MBV) gây bệnh trên tôm sú (<i>Penaeus monodon</i>) Việt Nam Sequence analysis of the gene encoding polyhedrin of monodon baculovirus (MBV) infected in penaeid shrimp (<i>Penaeus monodon</i>) in Vietnam	55-61
Lê Thanh Hương, Nguyễn Nhật Linh, Bùi Mạnh Minh, Hà Hồng Hạnh, Huỳnh Thị Thu Huệ, Nông Văn Hải, Hà Văn Huân, Lê Thị Thu Hiền. Ứng dụng mã vạch DNA hỗ trợ định loại loài một số mẫu sâm thuộc chi Nhân sâm (<i>Panax L.</i>) Application of DNA barcodes in identification of ginseng samples in the genus <i>Panax L.</i>	63-72
Dương Tấn Nhật, Nguyễn Xuân Tuấn, Nguyễn Thị Thùy Anh, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Hoàng Thanh Tùng, Vũ Thị Hiền, Vũ Quốc Luận, Bùi Thế Vinh,	73-85

- Trần Công Luận.** Ảnh hưởng của điều kiện mô phỏng không trọng lực lên khả năng nảy mầm, sinh trưởng, phát triển và tích lũy hợp chất thứ cấp của sâm Bồ chính nuôi cấy *in vitro*
Effects of simulated microgravity on seed germination, growth, development and accumulated secondary compounds of *Hibiscus sagittifolius* Kurz. cultured *in vitro*
- Hoàng Thị Kim Hồng, Phạm Thị Hồng Trang, Trương Thị Bích Phượng, Nguyễn Thị Thu Thủy, Ngô Thị Minh Thu, Nguyễn Thị Quỳnh Trang.** Ảnh hưởng của việc xử lý stress thiếu nước lên hình thái lá và sự biểu hiện của gen mã hóa dihydrodipicolinate synthase (DHDPS) ở cây *Mesembryanthemum crystallinum* 87-95
Effects of water shortage stress on the morphology and expression of the gene encoding dihydrodipicolinate synthase (DHDPS) in *Mesembryanthemum crystallinum*
- Đỗ Thị Gấm, Phan Hồng Khôi, Chu Hoàng Hà, Phạm Bích Ngọc, Nguyễn Khắc Hưng, Hà Thị Thanh Bình, Nguyễn Như Chương, Lường Tú Nam, Nguyễn Thị Thúy Bình.** Ảnh hưởng của ánh sáng LED đến sự sinh trưởng, phát triển của cây lan Kim tuyến (*Anoectochilus roxburghii*) *in vitro* 97-104
Effect of LED light on *in vitro* growth and development of *Anoectochilus roxburghii*
- Phạm Đình Dũng, Nguyễn Tiến Thắng, Dương Hoa Xô, Lê Quang Luân.** Nghiên cứu hiệu lực kháng nấm *Collectotrichum capsici* gây bệnh thán thư trên cây ớt của phân đoạn oligochitosan chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ kết hợp xử lý hóa học 105-112
Study on antifungal effect of oligochitosan fractions prepared by irradiation combined with chemical treatment on *Collectotrichum capsici* causing anthracnose in capsicum
- Nguyễn Thị Thu Liên, Nguyễn Hồng Sơn, Lê Thị Tuyết Nhân.** Ảnh hưởng của hàm lượng chất dinh dưỡng đến sinh khối và hàm lượng lipid của chủng tảo silic nước mặn *Chaetoceros* ChTA 113-120
Biomass and lipid production of marine diatom *Chaetoceros* ChTA at different nutrient concentrations
- Nguyễn Khởi Nghĩa, Nguyễn Thị Kiều Oanh.** Phân lập và tuyển chọn dòng vi khuẩn chịu mặn có khả năng hòa tan lân từ nền đất lúa trong mô hình canh tác lúa - tôm tại một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long của Việt Nam 121-131
Isolation, characterization and identification of phosphate solubilizing bacteria from rice-shrimp rotational farming system in salt affected soil areas of the Mekong Delta of Vietnam
- Lê Thị Thủy, Lê Thu Ngọc, Hồ Thị Thương, Phạm Bích Ngọc, Lâm Đại Nhân, Chu Hoàng Hà.** Nghiên cứu sự biểu hiện tạm thời của kháng nguyên H7 của virus cúm A/H7N9 trong cây thuốc lá (*Nicotiana benthamiana*) bằng phương pháp *Agro-infiltration* 133-140
Study on the transient expression of hemagglutinin antigen of influenza A/H7N9 virus in *Nicotiana benthamiana* using *Agro-infiltration*
- Nguyễn Thanh Vũ, Huỳnh Quyền, Dương Hoa Xô, Lê Quang Luân.** Nghiên cứu chế tạo chế phẩm oligochitosan-bạc nano ứng dụng làm phân bón kháng bệnh héo vàng do nấm *Fusarium oxysporum* gây ra trên cà chua 141-149
Preparation of the oligochitosan-silver nanoparticles with a potential application as an antifungal fertilizer against *Fusarium oxysporum* causing fusarium wilt disease on tomato
- Ta Thị Thu Thủy, Nguyen Huy Hoang.** Transformation of glycosyltransferase *dnrS* and auxiliary *dnrQ* genes into the *Streptomyces peucetius* MH9.2 for the enhance of Doxorubicin production 151-159
Biến nạp gene glycosyltransferase *dnrS* và gen hỗ trợ *dnrQ* vào tế bào *Streptomyces peucetius* MH9.2 làm tăng khả năng tổng hợp Doxorubicin

- Nguyễn Huy Thuần, Nguyễn Thành Trung, Đồng Văn Quyền, Vũ Thị Thu Hằng, Jae Kyung Sohng.** Tổng hợp morin-3-*O*-rhamnopyranoside ở vi khuẩn *Escherichia coli* cải biến di truyền 161-168
Biosynthesis of morin-3-*O*-rhamnopyranoside in a genetically engineered *Escherichia coli*
- Trịnh Thành Trung, Đinh Thị Tuyết Vân, Nguyễn Phương Liên, Đào Thị Lương, Dương Văn Hợp.** Tiềm năng ứng dụng tạo chế phẩm làm phân bón hữu cơ sinh học từ các chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* phân lập từ các vùng sinh thái khác nhau tại Việt Nam 169-179
Potential application on preparation for bio-fertilizer using *Bacillus velezensis* strains isolated from various regions in Vietnam
- Trần Minh Chí, Nghiêm Ngọc Minh.** Phân lập, làm giàu và nghiên cứu hiệu quả xử lý nước thải nhiễm mặn của chủng nấm men chịu mặn *Candida* sp. YH 181-187
Isolation, enrichment of a halophilic yeast *Candida* sp. YH and its treatability study of saline wastewater
- Kiều Thị Quỳnh Hoa, Nguyễn Thị Yên, Đặng Thị Yến.** Tối ưu hoá khả năng tạo chất hoạt động bề mặt sinh học của chủng nấm men *Candida tropicalis* 1214-BK14 phân lập từ giếng khai thác dầu ở mỏ Bạch Hổ - Vũng Tàu, Việt Nam bằng phương pháp đáp ứng bề mặt 189-196
Optimization of biosurfactant production for enhanced crude-oil degradation by a *Candida tropicalis* 1214-BK14 isolated from White Tiger oilfield - Vung Tau, Vietnam

PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ GEN MÃ HOÁ POLYHEDRIN CỦA MOMODON BACULOVIRUS (MBV) GÂY BỆNH TRÊN TÔM SÚ (*PENAEUS MONODON*) VIỆT NAM

Nguyễn Thị Giang An^{1,✉}, Đồng Văn Quyền², Đinh Duy Kháng²

¹Viện Sư phạm tự nhiên, Trường Đại học Vinh

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: nguyengiangan@gmail.com

Ngày nhận bài: 09.11.2016

Ngày đăng bài: 28.3.2017

TÓM TẮT

Baculovirus là virus gây bệnh trên tôm nuôi, có cấu trúc di truyền ở dạng DNA xoắn kép, kích thước bộ gen 119.638 bp, virion ở trạng thái tự do hoặc bao bọc bởi vỏ capsid vùi trong thể ẩn (OBs). Thể ẩn được cấu trúc bởi chất nền polyhedrin, chúng bảo vệ cho virus tồn tại được bên ngoài môi trường cho đến khi virus chui vào ấu trùng của tôm. Polyhedrin là một loại protein có kích thước 17 đến 23 nm đồng thời là kháng nguyên bề mặt quyết định cho việc chẩn đoán *Baculovirus*. Phân tích trình tự gen mã hóa polyhedrin (*polhed*) cho thấy khung đọc mở (ORF) của chúng dài 1.371 bp, mã hóa cho protein gồm 457 amino acid. So sánh với trình tự nucleotide của polyhedrin công bố trên GenBank cho thấy, tính tương đồng của gen *polhed* phân lập tại Việt Nam với Thái Lan, Đài Loan và Ấn Độ có sự tương đồng lần lượt là 97%, 97% và 94%. Phân tích sâu hơn ở mức độ protein, tại đầu N của polyhedrin ở Việt Nam có sự sai khác lớn so với polyhedrin phân lập ở Thái Lan. Đặc biệt là tại vị trí amino acid (aa) 72-73 có chèn thêm 4 aa (NEPM) và vị trí amino acid 81-82 chèn thêm 7 aa (PYHNSPN) mà polyhedrin từ Thái Lan không có. Ngoài ra tại một số vị trí khác cũng có sự biến đổi như: p.Thr55Gly, p.Glu63Asp, p.Asn72Asp, p.Glu92Gly, p.Met93Leu, p.Lys108Asn và p.Lys113Asn. Điều đáng chú ý, đoạn trình tự này đã được khẳng định là điểm quyết định kháng nguyên. Vì vậy, nên sử dụng các kit nhập ngoại cho việc chẩn đoán MBV sẽ có độ đặc hiệu không cao. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng virus MBV gây bệnh trên tôm sú ở Việt Nam đã có sự biến đổi lớn về mặt di truyền so với chủng gây bệnh ở Thái Lan và một số nước trên thế giới.

Từ khóa: *Monodon baculovirus (MBV)*, *Nucleopolyhedrovirus*, *Polyhedrin*, *polhed*, *Tôm sú*

MỞ ĐẦU

Nuôi tôm nói riêng và nuôi trồng thủy sản nói chung đã trở thành ngành kinh tế mũi nhọn của nước ta, mang lại giá trị xuất khẩu trên 3,5 tỷ USD/năm. Năm 2015 sản lượng tôm sú đạt 249.000 tấn, tôm thẻ chân trắng đạt 344.600 tấn (Bộ NN&PTNT, 2015). Chiến lược phát triển nuôi trồng thủy sản của các nước trong khu vực và Việt Nam là phát triển ngành nuôi tôm bền vững, hạn chế tới mức tối thiểu các tác động tiêu cực đến môi trường và sinh thái. Tuy nhiên, trong những năm qua ngành nuôi tôm công nghiệp đang đối mặt tình trạng bệnh tật và sự suy thoái về môi trường. Trong đó, baculovirus là tác nhân gây bệnh phổ biến trên tôm sú với tỷ lệ nhiễm từ 30 đến 100% (Đặng Thị Hoàng Oanh *et al.*, 2005).

Về phân loại học, baculovirus gây bệnh thuộc họ *Baculoviridae*, chi *Nucleopolyhedrovirus*, được

chi thành hai type: type BP (*Baculovirus penaei*) gây bệnh trên tôm thẻ chân trắng (Couch, 1974) và MBV gây bệnh trên tôm sú (Lighter, Redman, 1981). Tuy nhiên, theo danh pháp phân loại virus của Ủy ban phân loại virus Quốc tế (ICTV) thì baculovirus gây bệnh trên tôm sú được đặt tên là monodon nucleopolyhedrovirus (PemoNPV) (Fauquet *et al.*, 2005). Ban đầu, PemoNPV = MBV được công bố là virus đặc trưng cho tôm sú. Tuy nhiên, sau này các nghiên cứu đã chỉ ra rằng virus này gây bệnh trên tất cả các loài thuộc giống tôm he (Manivannan *et al.*, 2004). Baculovirus phân bố ở nhiều vùng nuôi tôm trên thế giới như Australia (Vickers *et al.*, 2000), Ấn Độ (Vaseeharan, Ramasamy, 2003) và Thái Lan (Fegan *et al.*, 1991; Flegel, 2006). Vật liệu di truyền của baculovirus là DNA ở dạng siêu xoắn (Mari *et al.*, 1993), kích thước genome là 119.638 bp (Yang *et al.*, 2014), các virion của chúng ở trạng thái tự do hoặc bao bọc bởi

vỏ capsid virus trong thể ẩn (occlusion body) (Ramasamy *et al.*, 2000). Bao quanh thể ẩn của MBV là những lớp chất nền protein được cấu trúc từ các tiểu thể polyhedrin có kích thước 17 đến 23nm (Bonami *et al.*, 1997). Các phân tử polyhedrin là các kháng nguyên bề mặt quyết định cho việc chẩn đoán MBV. Cấu trúc di truyền của gen mã hóa cho polyhedrin (*polhed*) đã được công bố với kích thước 1.588 bp (Chaivisuthangkura *et al.*, 2008) và mới đây nhóm tác giả Đài Loan (Yang *et al.*, 2014) đã giải mã toàn bộ genome của MBV chiều dài gen *polhed* là 1359 bp. So sánh trình tự gen mã hóa cho polyhedrin phân lập tại Việt Nam cho thấy có sự sai khác về mặt di truyền với gen *polhed* đã được công bố trên Genbank. Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành phân tích sự biến đổi trình tự gen mã hóa polyhedrin trong cấu trúc di truyền của chủng MBV phân lập ở Việt Nam với trình tự polyhedrin của MBV được công bố trên Genbank, nhằm định hướng cho các nghiên cứu tiếp theo trong lĩnh vực chẩn đoán phân tử.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mẫu tôm Post larvae được cung cấp bởi Trung tâm giống hải sản Quốc gia Vũng Tàu và trại tôm giống Quỳnh Liên, Quỳnh Lưu, Nghệ An và Hải Phòng.

Vector pCR2.1 (Invitrogen, Mỹ) được dùng để tách dòng gen mã hóa polyhedrin trong tế bào *E. coli* chủng DH5 α .

Các hóa chất, sinh phẩm dùng cho nghiên cứu được cung cấp từ các hãng BioRad, Invitrogen, New England Biolabs, Sigma (Mỹ), Fermentas, Merck (Đức), các enzyme giới hạn *NcoI* và *HindIII* (New England Biolabs, Mỹ).

Phương pháp

Tách chiết DNA tổng số và nhân dòng gen mã hóa polyhedrin

DNA tổng số được tách từ mô gan tụy bằng kit tách chiết DNA của Bioneer, sau đó sử dụng 2 μ l (khoảng 50-100 ng) để làm khuôn cho phản ứng PCR nhằm khuếch đại gen *polhed* bằng cặp mồi đặc hiệu có vị trí nhận biết của cặp enzyme giới hạn *NcoI* và *HindIII* với trình tự như sau:

FP-5'- TACCCATGGCCTTCGACGATAGCATGATG-3'

RP-5'-TGATAAGCTT TGTATGATGCGTCTTCAGG-3'

Phản ứng PCR được thực hiện với chu trình nhiệt: 1 chu kỳ ở 94°C/3 phút, 30 chu kỳ (95°C/50 giây, 53°C/50 giây, 72°C/1 phút 20 giây), chu kỳ cuối ở 72°C/8 phút. Sản phẩm PCR là gen polyhedrin từ mẫu Việt Nam (gọi là *polhed*) được tinh sạch bằng PCR Purification kit (QIAGEN) và được tách dòng vào vector pCR2.1 (Invitrogen). Trình tự gen sau khi tách dòng được xác định theo phương pháp của Sanger (1997) trên máy phân tích trình tự ABI PRISM®3100 Genetic Analyzer. Dữ liệu được xử lý bằng phần mềm Bioedit.

Phân tích đặc điểm gen *polhed*, trình tự amino acid và dựng cây phân loại

Gen *polhed* sau khi giải trình tự, sử dụng phần mềm BLAST trong Ngân hàng gen và sử dụng phần mềm ClustalW2 đối chiếu với trình tự amino acid tương ứng của các gen *polhed* đã được công bố trên Ngân hàng gen (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Phân tích quan hệ phả hệ bằng chương trình MEGA6.06 (Tamura *et al.*, 2013).

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Nhân và tách dòng gen mã hóa polyhedrin

DNA tổng số đã được tách chiết từ gan tụy của các mẫu tôm nhiễm MBV thu tập từ nhiều vùng khác nhau của Việt Nam. Đoạn gen này được khuếch đại bằng cặp mồi thiết kế dựa trên trình tự gen mã hóa polyhedrin đã được công bố trên Ngân hàng gen (GenBank) có mã số EU251062 (Chaivisuthangkura *et al.*, 2008), cặp mồi này có vị trí nhận biết của enzyme *NcoI* ở đầu 5' và vị trí nhận biết *HindIII* ở đầu 3'. Kết quả điện di trên gel agarose 1% thể hiện ở hình 1A. Đoạn gen này được đặt tên là *polhed*.

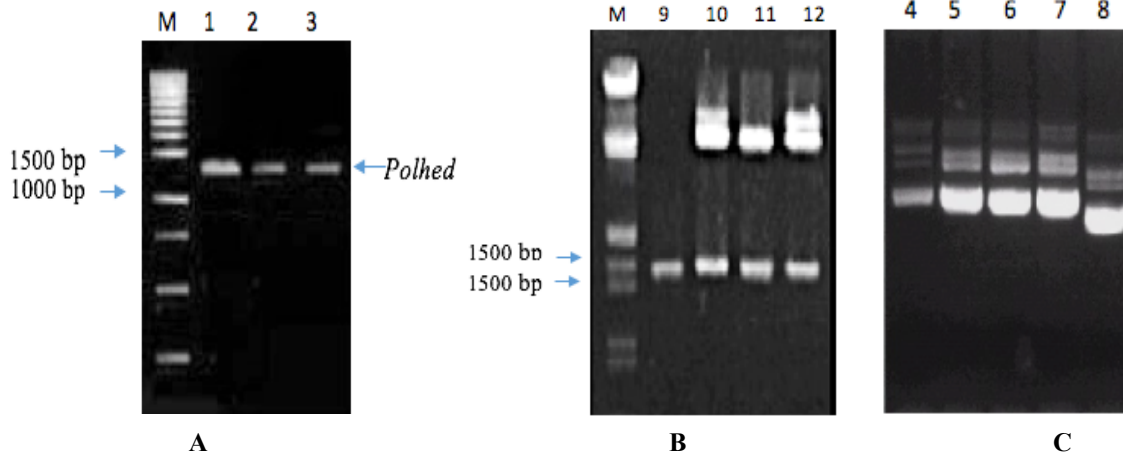
Phân tích kết quả hình 1A cho thấy, sản phẩm PCR thu được chỉ có một băng DNA đặc hiệu, sáng đậm và không gián đoạn. Như vậy, đoạn gen mã hóa cho polyhedrin có thể đã được khuếch đại. Theo tính toán lý thuyết, dựa vào trình tự *polhed* đã biết trên GenBank, đoạn gen này có thể có kích thước khoảng 1.350 bp. Kết quả điện di trên hình 1 cũng có kích thước tương đương. Tuy nhiên, để khẳng định chắc chắn cần phải giải trình tự đoạn gen này.

Các sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được gắn vào vector pCR®2.1 (Invitrogen), tiếp tục được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng DH5 α và nuôi trên 3 đĩa môi trường LB khác nhau có bổ sung Ampicillin, X-gal và IPTG.

Muốn lựa chọn được dòng plasmid mang đúng gen mã hóa polyhedrin (*polhed*), mỗi đĩa nuôi cấy sẽ

chọn 4 khuẩn lạc màu trắng và 1 khuẩn lạc màu xanh, tách plasmid và điện di kiểm tra trên gel agarose 1%. Kết quả điện di ở hình 1B cho thấy, các khuẩn lạc màu trắng có kích thước cao hơn so với khuẩn lạc màu xanh, chứng tỏ plasmid có thể mang gen ngoại lai. Sau đó, các dòng plasmid này được cắt kiểm tra bằng enzym giới hạn *EcoRI* tạo ra 2 băng,

một băng tương đương với kích thước sản phẩm PCR và một băng bằng kích thước của vector pCR2.1 (Hình 1C). Điều này chứng tỏ đoạn gen ngoại lai đã chèn vào vector tách dòng. Các plasmid này được tách chiết từ 6 khuẩn lạc của 3 đĩa được tinh sạch để xác định trình tự gen *polhed*.



Hình 1. Sản phẩm PCR và tách dòng gen mã hóa polyhedrin. M: Thang DNA chuẩn 1 kb (Fermentas); A: 1, 2, 3: Sản phẩm PCR đoạn gen *polhed*. B: Kết quả tách plasmid tái tổ hợp; 4- 7 DNA của plasmid tách từ các khuẩn lạc trắng; 8: DNA plasmid pCR[®] 2.1 tách từ khuẩn lạc xanh; C: Kiểm tra sự có mặt của *polhed* trong pCR2.1- *polhed* bằng enzyme *EcoRI*; 9: gen *polhed* được khuếch đại bằng PCR; 10-12: Các dòng plasmid được xử lý bằng enzyme *EcoRI*.

Phân tích đặc điểm gen, dựng cây phân loại và phân tích trình tự amino acid

Để khẳng định chắc chắn các dòng plasmid tái tổ hợp trên mang gen *polhed*, trình tự gen đã được xác định trên máy xác định trình tự DNA tự động (ABI 3100). Truy cập Ngân hàng gen bằng chương trình BLAST cho thấy chuỗi nucleotide từ tôm sú nhiễm MBV ở Việt Nam lặn gen mã hoá polyhedrin và như vậy, gen *polhed* đã được tách dòng thành công. ORF của gen *polhed* tách dòng dài 1.371 bp, mã hóa 456 amino acid và một mã kết thúc TAA. Cho đến nay ngoài nghiên cứu của chúng tôi, trên thế giới đã có 10 trình tự gen mã hóa polyhedrin từ MBV được công bố, trong đó có trình tự gen phân lập tại Thái Lan, Ấn độ. Đặc biệt toàn bộ gen của MBV của Đài Loan đã được công bố (Yang *et al.*, 2014).

Phân tích và so sánh các trình tự gen *polhed* của MBV thu nhận từ các vùng miền khác nhau cho thấy có mức độ tương đồng là 100%. Trình tự gen này đã được công bố trên Genbank với mã số JN604546.1. Kết quả so sánh 09 trình tự gen *polhed* tương ứng được công bố trên Genbank cho thấy mức tương đồng đạt từ 94-99%, thể hiện ở bảng 1.

Dựa vào khoảng cách di truyền và tỷ lệ % tương đồng trình tự gen *polhed* của MBV công bố trên Genbank, cây phát sinh chủng loại của MBV (H2) đã được xây dựng bằng phần mềm MEGA6.06. Kết quả cho thấy, MBV của Việt Nam có quan hệ gần gũi với MBV phân lập ở Ấn Độ, với độ tương đồng đạt 99% (JX091340-Ấn Độ), với MBV phân lập ở Thái Lan là 97% (EU251062), với MBV ở Đài Loan (KJ184318) là 97% và với MBV phân lập ở Ấn Độ (JN194201) là 94 % (Bảng 1). Polyhedrin là loại protein tinh thể đặc trưng của baculovirus thuộc họ *Baculoviridae*, có vai trò là chất nền bảo vệ vỏ của virion, giữ cho hạt virus ổn định trong điều kiện biến đổi của môi trường, tránh được sự phân giải của các enzym từ gan tụy. Polyhedrin cũng là phần quyết định kháng nguyên khi virus xâm nhiễm vào cơ thể vật chủ và tạo đáp ứng miễn dịch kháng lại sự lây nhiễm của MBV (Satidkanitkul *et al.*, 2005). Việc xác định trình tự gen *polhed* có ý nghĩa lớn cả về nghiên cứu cơ bản để tìm hiểu sự biến đổi của virus theo các vùng địa lý và về việc ứng dụng trong chẩn đoán đặc hiệu. Việt Nam, Thái Lan, Đài Loan và Ấn Độ là những nước về mặt địa lý tương đối cận kề nhau, việc nghiên cứu MBV gây bệnh trên tôm sú

của các nước này sẽ cho chúng ta nhiều thông tin giá trị về sự tiến hóa hay biến đổi của virus. So sánh với các trình tự gen công bố trên Genbank, gen *polhed* của MBV ở Việt Nam có độ tương đồng rất cao so với gen *polhed* của MBV phân lập ở Thái Lan (EU251062), tương đồng với trình tự của gen *polhed* MBV phân lập ở Đài Loan (KJ184318) là 97% và gen *polhed* của MBV phân lập ở Ấn Độ (JN194201) 94 % (Bảng 1). Kết quả so sánh sai khác trình tự gen *polhed* của MBV Việt Nam với gen này ở MBV Thái Lan không cao, song điều đáng chú ý là có các đoạn DNA chèn vào trong gen *polhed* Việt Nam mà trong trình tự gen *polhed* của Thái Lan

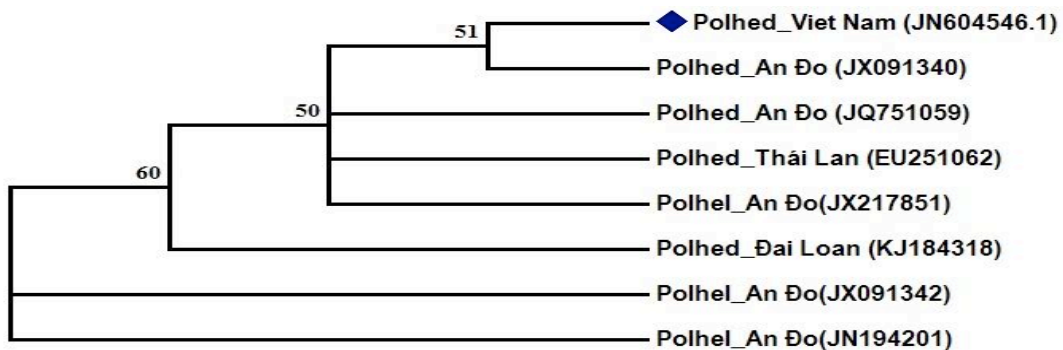
không có.

Nếu đoạn này là điểm quyết định kháng nguyên thì việc sử dụng các kit chẩn đoán ngoại nhập vào chủng virus của Việt Nam sẽ ảnh hưởng tới độ đặc hiệu.

Sự biến đổi về trình tự nucleotide sẽ không ảnh hưởng nhiều đến đặc tính của virus nếu như không dẫn đến sự biến đổi về trình tự amino acid mà chúng mã hóa. Để kiểm tra sự biến đổi gen mã hóa polyhedrin ở mức độ protein, trình tự nucleotide đã được dịch ra trình tự amino acid và sử dụng phần mềm ClustalW2 để so sánh.

Bảng 1. Hệ số tương đồng về trình tự giữa gen *polhed* ở Việt Nam và trên Thế Giới.

Hệ số sai khác (%)	Hệ số tương đồng (%)								GenBank
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	
(1)	99	99	99	98	92	100	97	JQ751059- Ấn Độ (1)	
(2)	3	99	99	98	92	99	97	KJ184318-Đài Loan (2)	
(3)	1	1	99	98	92	100	97	EU251062-Thái Lan (3)	
(4)	1	1	1	98	92	99	99	JX091340-Ấn Độ (4)	
(5)	2	2	2	2	86	99	97	JX091342- Ấn Độ (5)	
(6)	8	8	8	8	14	88	94	JN194201- Ấn Độ (6)	
(7)	0	1	0	1	1	12	99	JX217851- Ấn Độ (7)	
(8)	3	3	3	1	3	6	1	JN604546-Việt Nam (8)	



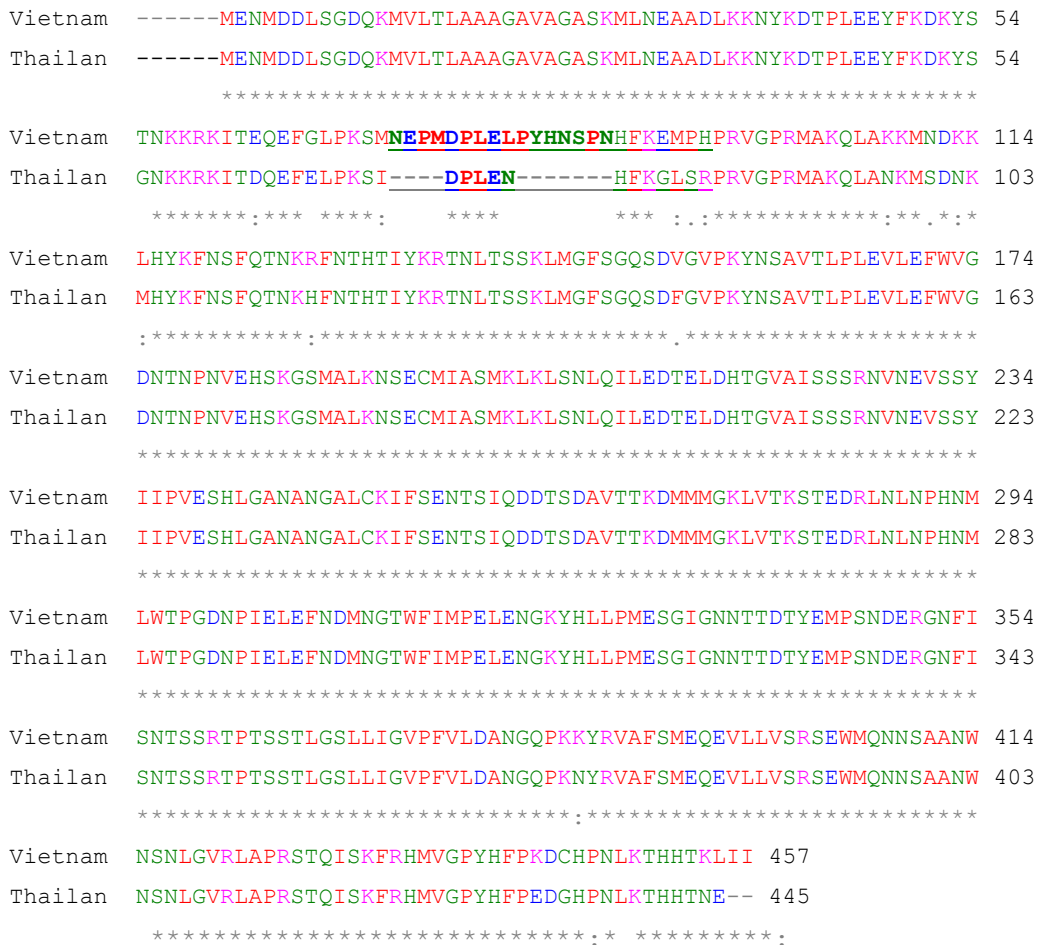
Hình 2. Cây phát sinh chủng loại của MBV dựa trên việc so sánh trình tự nucleotide của đoạn gen *polhed*.

Kết quả (Hình 3) cho thấy, sự khác biệt về trình tự nucleotide dẫn đến sự biến đổi khá lớn về trình tự amino acid. Tại đầu N, polyhedrin từ Việt Nam có sự sai khác lớn với polyhedrin từ Thái Lan, đặc biệt là polyhedrin từ Việt Nam được chèn thêm một đoạn tại vị trí amino acid (aa) 72-73 gồm 4 aa (NEPM) và vị trí amino acid 81-82 gồm 7 aa (PYHNSPN) mà polyhedrin từ Thái Lan không có. Phân tích sâu hơn

ở mức độ protein chúng tôi thấy, tại đầu N, polyhedrin từ Việt Nam có sự sai khác lớn so với polyhedrin từ Thái Lan. Ngoài ra, tại một số vị trí khác cũng có sự biến đổi như: p.Thr55Gly, p.Glu63Asp, p.Asn72Asp, p.Glu92Gly, p.Met93Leu, p.Lys113Asn. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, chủng virus MBV gây bệnh trên tôm sú ở Việt Nam đã có sự biến đổi nhất định so

với chủng gây bệnh ở Thái Lan. Mặc dù vậy, để có kết luận chính xác về sự biến đổi di truyền của chủng MBV đang lưu hành ở Việt Nam với các chủng trên thế giới phải giải mã toàn bộ genome của virus. Trong khuôn khổ bài báo này chúng tôi mới chỉ giải mã toàn bộ gen mã hóa polyhedrin và so sánh sự biến đổi của gen này. Tuy nhiên đây là gen kháng nguyên quan trọng liên quan tính đáp ứng miễn dịch của virus, nên thông tin thu được từ việc giải trình từ

gen *polhed* lày nghĩa. Nếu đoạn chèn thêm trong trình tự gen *polhed* của MBV phân lập ở Việt Nam nằm trong vùng mang các quyết định kháng nguyên quan trọng thì việc sử dụng các kit chẩn đoán ngoại nhập để chẩn đoán chủng virus của Việt Nam sẽ có độ đặc hiệu không cao. Nói cách khác, việc phát triển kit chẩn đoán MBV trên cơ sở các kháng nguyên có nguồn gốc từ các chủng virus đang lưu hành trong nước là điều cần thiết.



Hình 3. So sánh trình tự amino acid suy diễn từ gen *polhed* của MBV gây bệnh trên tôm sú Việt Nam với trình tự amino acid từ MBV gây bệnh trên tôm sú của Thái Lan (EU251062). Vùng khác biệt được in đậm và gạch bên dưới.

KẾT LUẬN

Phân tích đặc điểm di truyền của gen *polhed* mã hoá cho kháng nguyên polyhedrin từ virus MBV gây bệnh trên tôm sú nuôi ở Việt Nam cho thấy, đoạn gen này có chiều dài 1.371 nucleotide mã hóa cho 456 amino acid. Hệ số tương đồng với các gen *polhed* ở

Thái Lan, Ấn Độ và Đài Loan từ 94-99%. Dịch mã gen *polhed* sang chuỗi polypeptide và so sánh với trình tự amino acid đã được công bố của Thái Lan, kết quả chỉ ra sự sai khác tại các vị trí liên quan đến điểm quyết định kháng nguyên. Những biến đổi di truyền này là cơ sở cho việc phát triển các kit chẩn đoán mới, đặc hiệu cho chủng virus MBV đang lưu hành ở Việt Nam, nhằm đề rànhững chiến lược

phòng chống hiệu quả bệnh do MBV gây ra trên nuôi tôm Việt Nam.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện với sự tài trợ kinh phí của Bộ Khoa học và Công nghệ thông qua nhiệm vụ “Lập bản đồ gen tôm sú (*Penaeus monodon*)”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2015) Báo cáo kết quả thực hiện kết hoạch tháng 12 năm 2015 ngành nông nghiệp và phát triển nông thôn.

Bonami JR, Aubert H, Poulos BT, Lightner (1997) The polyhedra of the occluded baculoviruses of marine decapod crustacea: A unique structure, crystal organization, and proposed model." *J Struct Biol* 120(2): 134–145.

Chaivisuthangkura P, Tawilert C, Tejangkura T, Rukpratanporn S, Longyant S, Sithigorngul W, Sithigorngul P(2008) Molecular isolation and characterization of a novel occlusion body protein gene from *Penaeus monodon* nucleopolyhedro- virus. *Virology* 381: 261–267.

Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, BallLA(2005)Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of viruses Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Elsevier Academic Press, San Diego*.

Fegan DF, Flegel TW, Sriurairatana S, Waiakruta M, (1991) The occurrence, development and histopathology of monodon baculovirus in *Penaeus monodon* in Southern Thailand. *Aquaculture* 96: 205–217.

Manivannan S, Kennedy B, Karunasagar I, Karunasagar I(2004) Prevalence of monodon baculovirus in wild

Metapenaeus species along the southwest coast of India. *Aquaculture* 232: 63–67.

Mari J, Bonami JR, Poulos B, Lightner DV (1993) Preliminary characterization and partial cloning of the genome of a baculovirus from *Penaeus monodon* (PmSNPV = MBV). *Dis Aquat Org* 16: 207–215.

Ramasamy P, Rajan PR, Purushothaman V, Brennan GP (2000) Ultrastructure and pathogenesis of monodon baculovirus (PmSNPV) in culture larvae and natural brooders of *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 184: 45–66.

Vaseeharan B, Ramasamy P (2003) Abundance of potentially pathogenic micro- organisms in *Penaeus monodon* larvae rearing systems in India. *Microbiol Res* 158: 299–308.

Vickers JE, Webb R, Young PR (2000) Monodon baculovirus from Australia: ultrastructural observation. *Dis Aquat Org* 39: 169–176.

Yang YT, Lee DY, Wang Y, Hu JM, Li WH, Leu JH, Chang GD, Ke HM, Kang ST, Lin SS, Kou GH, Lo CF(2014) The genome and occlusion bodies of marine *Penaeus monodon* nudivirus (PmNV, also known as MBV and PemoNPV) suggest that it should be assigned to a new nudivirus genus that is distinct from the terrestrial nudiviruses. *BMC Genomic* 15:628-651.

Satidkanitkul A, Sithigorngul P, Sangoum W, Rukpratanporn S, Sriurairatana S, Withyachumnankul B, Flegel TW (2005) Synthetic peptide used to develop antibodies for detection of polyhedrin from *P. monodon* baculovirus (MBV). *Diseases of Aquatic Organisms* 65: 79–84.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/165935734#feature_165935734

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/355527189>

SEQUENCE ANALYSIS OF THE GENE ENCODING POLYHEDRIN OF MONODON BACULOVIRUS (MBV) INFECTED IN PENAEID SHRIMP (*PENAEUS MONODON*) IN VIETNAM

Nguyen Thi Giang An¹, Dong Van Quyen², Dinh Duy Khang²

¹*Institute of Natural sciences Education, Vinh University*

²*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and technology*

SUMMARY

Monodon Baculovirus (MBV) is a causative agent in farmed shrimp. It is a double-stranded DNA virus with genome size of 119.638 bp. MBV virions are free in the nuclei or covered by the occlusion bodies (Obs) constructed by polyhedrin matrix proteins of MBV. OBs serve to protect the occluded virions from the outside environment for extended periods until they are ingested by insect larvae. Polyhedrin is a type of protein covering the virus with size from 17 to 23 nm, as well as a surface antigen used for Baculovirus detection. Sequence analysis of the gene coding for polyhedrin (*polhed*) showed that their open

reading frame (ORF) was 1,371 bp long and coding for a polypeptide of 457 amino acids. The alignment of nucleotide sequences of all polyhedrin genes including those of MBV isolated in Vietnam and from GenBank showed that *polhed* from Vietnam has 97%, 97% and 94% sequence identity compared to that of Thailand, Taiwan and India, respectively. Amino acid analysis revealed that the insertions occur at the sites 72-73 with 4 aa (*p.72_73insNEPM*) and at 81-82 with 7 aa (*p.81_82insPYHNSPN*) in the MBV isolated in Vietnam in comparison with that of Thailand. In addition, we also observed other amino acid substitutions in the protein sequence as: p.Thr55Gly, p.Glu63Asp, p.Asn72Asp, p.Glu92Gly, p.Met93Leu, p.Lys108Asn and p.Lys113Asn. These amino acid changes may affect the protein structure and reduce the specificity of the antigen. Therefore, the foreign kits for MBV diagnosis may have less specificity when using for inland MBV strains detection. The result of our research suggests that MBV which cause diseases in Vietnamese shrimps have notable genetic deviation compared to that of Thailand's and other countries' in the world.

Từ khoá: *Monodon baculovirus (MBV), Nucleopolyhedrovirus, Polyhedrin, Polhed, Penaeus monodon*