

## GIẢI MÃ VÀ PHÂN TÍCH VÙNG GEN TY THỂ DÀI 4,2 KB CỦA CÁC CHỦNG SÁN LÁ GAN NHỎ *OPISTHORCHIS VIVERRINI*

Ngô Thị Hương<sup>1</sup>, Lê Thanh Hoà<sup>2</sup>, Triệu Nguyên Trung<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Sốt rét-Ký sinh trùng-Côn trùng Quy Nhơn

<sup>2</sup>Viện Công nghệ sinh học

### TÓM TẮT

Vùng gen ty thể dài 4,2 kb của 3 chủng sán lá gan nhỏ *O. viverrini* ở Việt Nam, ký hiệu là OvQN (Quảng Nam), OvBD1 (Bình Định), OvPY3 (Phú Yên) và 1 chủng ở Thái Lan (OvKK) đã được thu nhận bằng kỹ thuật PCR, tách dòng, giải trình trình tự và phân tích đặc điểm của từng gen. Bắt đầu là gen mã hoá protein *nad4* và kết thúc là gen RNA vận chuyển *trnS1*, vùng gen ty thể 4,2 kb bao gồm 16 gen, trong đó có 5 gen mã hóa protein (*nad4* đầu 3'; *atp6*, *nad2*, *nad1*, *nad3*) và 11 gen mã hóa cho các RNA vận chuyển các amino acid (*trnQ*, *trnF*, *trnM*, *trnV*, *trnA*, *trnD*, *trnN*, *trnP*, *trnI*, *trnK* và *trnS1*, đầu 5'). Trật tự các gen mã hóa protein và các RNA vận chuyển cũng giống với các loài sán đẹt đã được nghiên cứu trước đây. Phân tích thành phần các nucleotide kiến tạo vùng gen ty thể dài 4,2 kb cho thấy, tất cả các chủng *O. viverrini* sử dụng 44,1 - 44,3% thymine (T); 12,2 - 12,3% cytosine (C); 15,9% adenine (A); và 27,6% guanine (G) để kiến tạo vùng gen ty thể dài 4,2 kb. Tỷ lệ A + T là 60% và G + C là 40%, tỷ lệ này cũng tương đồng với các loài sán lá nói chung, trừ sán máng (schistosomes) đã được khảo sát cho đến nay. Đây là công bố đầu tiên trên thế giới về trật tự và thành phần gen ty thể của loài sán lá gan nhỏ *O. viverrini*, 3 chủng ở Việt Nam đăng ký trong Ngân hàng gen là: OvQN (EU443832), OvBD1 (EU443831), OvPY3 (EU443833).

**Từ khóa:** *Opisthorchis viverrini*, PCR, vùng gen ty thể, sán lá, tương đồng

### MỞ ĐẦU

Bệnh sán lá gan nhỏ do *Opisthorchis viverrini* gây nên (opisthorchiasis) là bệnh ký sinh trùng truyền qua đường thức ăn, với khoảng 6 triệu người bị nhiễm. Phạm vi phân bố của loài này là các nước Đông Nam Á bao gồm Thái Lan, Lào, Campuchia và Việt Nam (Sripa *et al.*, 2007). Opisthorchiasis được nghiên cứu rộng rãi ở Thái Lan, nơi được coi là trung tâm dịch tễ của *O. viverrini* (Sripa, 2003; Jongsuksuntigul, Imsomboon, 2003). Một số bệnh về gan mật như bệnh đường mật, vàng da tắc mật, to gan, viêm túi mật, bệnh sỏi mật, ung thư túi mật (cholangiocarcinoma), được coi là có sự tham gia tích cực của *O. viverrini* (Sripa *et al.*, 2007).

Tại Việt Nam, bước đầu đã khảo sát dịch tễ học và chẩn đoán cho thấy sán lá gan nhỏ *O. viverrini* được xác định ở một số tỉnh phía Nam Trung Bộ và miền Trung (Le *et al.*, 2006; Nguyễn Văn Đê, Lê Thanh Hòa, 2006; Ngô Thị Hương *et al.*, 2006), tuy nhiên, cho đến nay, các dữ liệu toàn diện về hệ gen ty thể của loài sán này ở Việt Nam vẫn chưa có hoặc chưa đầy đủ. Việc phân tích một phần hệ gen ty thể và thành phần gen của *O. viverrini* gây bệnh ở người

từ các vùng địa lý khác nhau sẽ góp phần vào nghiên cứu ký sinh trùng phân tử ở Việt Nam và thế giới. Những kết quả đó cho phép ứng dụng lập bản đồ phân bố dịch tễ học phân tử, tìm hiểu cơ chế sinh bệnh, xây dựng các phương pháp và bộ sinh phẩm (kit) chẩn đoán nhanh, nghiên cứu các loại thuốc, vaccine giúp cho việc phát hiện và điều trị bệnh này một cách hiệu quả. Trong nghiên cứu này, dựa vào trật tự gen của loài sán lá (platyhelminth) (Le *et al.*, 2002), chúng tôi chọn vùng gen dài 4,2 kb (*nad4-trnS1*) của cả 3 chủng *O. viverrini* ở Việt Nam là OvQN, OvBD1 và OvPY3 để giải trình trình tự, phân tích thành phần gen so sánh với chủng OvKK của Thái Lan. Vị trí của vùng gen này giới hạn từ nucleotide thứ 2570 đến nucleotide thứ 6821 trong hệ gen ty thể, được đăng ký trong Ngân hàng gen: EU443832 (OvQN), EU443831 (OvBD1), EU443833 (OvPY3).

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Nguyên liệu

Nguyên liệu nghiên cứu là mẫu sán lá gan nhỏ trưởng thành, được xác định là *O. viverrini* về mặt

hình thái học và bước đầu giám định bằng sinh học phân tử (Ngô Thị Hương *et al.*, 2006). Mẫu sán được thu thập từ bệnh nhân tại các địa điểm sau: xã An Mỹ, huyện Tuy An, tỉnh Phú Yên, ký hiệu (OvPY3); xã Mỹ Thọ, huyện Phù Mỹ, tỉnh Bình Định, ký hiệu (OvBD1) và xã Tam Xuân 1, huyện Núi Thành, tỉnh Quảng Nam, ký hiệu (OvQN). Những nơi này được xác định là vùng lưu hành bệnh sán lá gan nhỏ. Mẫu của Thái Lan có xuất xứ tại Khon Kaen, do Trường Đại học Khon Kaen cung cấp.

### Phương pháp PCR thu nhận chuỗi gen

Để thu nhận được các chuỗi DNA hệ gen ty thể của các chủng *O. viverrini*, phương pháp PCR được sử dụng kết hợp, bao gồm PCR thông thường và PCR dài (long PCR). DNA tổng số của các mẫu sán được tách chiết bằng bộ sinh phẩm QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN Inc, USA). Các sản phẩm PCR được dòng hóa, giải trình trình tự và phân tích theo quy trình tổng quát như sau:

Phản ứng PCR dài (long PCR) được thực hiện trên máy MJ Thermal Cycler PCT-100 (MJ Research, USA), sử dụng bộ hóa chất Elongase kit (Invitrogen) theo chu trình nhiệt: 94°C/5 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ ở 94°C/30 giây, 54°C/1 phút; 68°C/12 phút. Phản ứng PCR thông thường (conventional PCR) thực hiện theo chu trình nhiệt: 94°C/5 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ ở 94°C/30 giây, 52°C/30 giây; 72°C/2 phút và cuối cùng là 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%, nhuộm bằng ethidium bromide, quan sát trên máy soi gel Wealtech (Mỹ). Sản phẩm PCR tinh

sạch được dòng hóa vào vector pCR2.1TOPO (TA-cloning Kit) của hãng Invitrogen. Các đoạn DNA trong plasmid tái tổ hợp được giải trình tự trên máy ABI3100 Avant Genetic Analyzer tại Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

### Thiết kế môi và chiến lược giải mã vùng gen ty thể

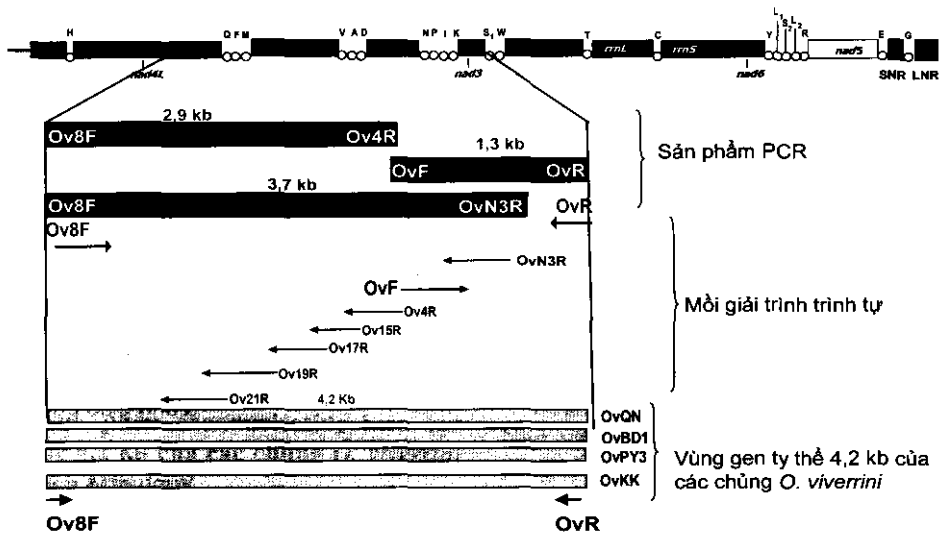
Môi được thiết kế trên cơ sở phân tích và so sánh các trình tự DNA hệ gen ty thể của chủng *O. viverrini* ở Thái Lan (OvKK) và *Clonorchis sinensis* (Việt Nam) đã được giải trình trình tự (số liệu chưa công bố). Các môi sử dụng để thu nhận sản phẩm PCR và giải trình trình tự, được trình bày ở bảng 1. Phản ứng PCR thông thường và PCR dài (long PCR) được sử dụng kết hợp để thu nhận vùng gen ty thể có kích thước 4,2 kb của các chủng *O. viverrini* của Việt Nam (OvQN, OvBD1, OvPY3) và của Thái Lan (OvKK) theo sơ đồ tổng quát giới thiệu ở hình 1.

### Xử lý số liệu

Các chuỗi nucleotide của các chủng OvQN, OvBD1, OVPY3 và OvKK sau khi giải trình trình tự được xử lý bằng chương trình SeqEdv1.03, sau đó so sánh sử dụng chương trình AssemblyLIGNv1.9c và MacVector8.2 (Accelrys Inc.) trên máy tính Macintosh để thu nhận toàn bộ trình tự vùng DNA ty thể có độ dài 4,2 kb; sau đó phân tích, so sánh về thành phần nucleotide và amino acid bằng các chương trình GENEDOC2.5 (Nicholas, Nicholas, 1999).

**Bảng 1.** Danh sách môi sử dụng trong phản ứng PCR và giải trình trình tự.

TT	Tên môi	Trình tự môi	Ghi chú
1	Ov8F	5'- GATTTGCGTTTTGGGGG -3'	Môi xuôi
2	OvN3R	5'- GCTCAATAAAGAGACCACGAAC -3'	Môi ngược
3	Ov4R	5'- AACCAACCAAACCACCTGC -3'	Môi ngược
4	Ov15R	5'- ACAGAATAAACTCACCCCC -3'	Môi ngược
5	Ov17R	5'- TCAACCGCCTCAACAACAC -3'	Môi ngược
6	Ov19R	5'- TACACCACGCATTATCCG -3'	Môi ngược
7	Ov21R	5'- AACTTACCTCTCCTCCCACCACAC -3'	Môi ngược
8	HF2	5'- GTAAAACGACGGCCAG -3'	Môi xuôi
9	HR	5'- CAGGAAACAGCATTGAC -3'	Môi ngược
10	OvF	5'- TACGCAGGTGGTTTGGTTG -3'	Môi xuôi
11	OvR	5'- AGCAGCGATAACACGACAGC -3'	Môi ngược



**Hình 1.** Sơ đồ tổng quát thu nhận vùng gen dài 4,2 kb của các chủng OvQN, OvBD1, OvPY3 ở Việt Nam và OvKK ở Thái Lan. Trên cùng là mô hình hệ gen ty thể các loài sán lá, với các khung gen mã hoá protein và vị trí gen RNA vận chuyển.

## KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### Kết quả thu nhận và trật tự sắp xếp gen trong vùng gen ty thể dài 4,2 kb của các chủng sán lá gan nhỏ *O. viverrini*

Giới hạn giữa cặp mỗi Ov8F-OvR (Bảng 1, Hình 1) là vùng gen dài 4,2 kb được chọn để giải trình tự và phân tích, dựa vào trật tự gen của loài sán lá (platyhelminth) (Le *et al.*, 2002). Sử dụng chương trình MacVector8.2 (Accelrys Inc.) để phân tích trật tự các gen, kết quả cho thấy, vùng gen ty thể này chứa 5 gen mã hóa protein là *nad4*, *atp6*, *nad2*, *nad1*, *nad3* và 11 gen mã hóa cho RNA vận chuyển amino acid là *trnQ* (glutamine), *trnF* (phenylalanine), *trnM* (methionine), *trnV* (valine), *trnA* (alanine), *trnD* (aspartate), *trnN* (asparagine), *trnP* (proline), *trnI* (isoleucine), *trnK* (Lysine) và *trnS1* (serine) (Hình 1). Cụm gen [*nad4*, *atp6*, *nad2*, *nad1*, *nad3*] là các gen mã hóa và chịu trách nhiệm tổng hợp các enzyme có vai trò quan trọng trong hoạt động dẫn truyền điện tử và tạo năng lượng của ty thể. Những gen này thông thường được bảo tồn cao giữa các chủng trong loài, và giữa các loài trong một giống và lớp phân loại.

### Phân tích trật tự sắp xếp các gen trong vùng DNA ty thể dài 4,2 kb

Trong vùng 4,2 kb này, trật tự các gen được sắp

xếp như trình bày ở bảng 2. Bắt đầu là một phần gen *nad4* với độ dài là 807 bp, tiếp đến là vùng giao gen (intergenic region) có độ dài 7 bp, rồi đến RNA vận chuyển, *trnQ* (glutamine) dài 63 bp, đến 1 vùng giao gen ngắn (12 bp), tiếp đến là 2 gen RNA vận chuyển *trnF* (phenylalanine) có độ dài là 66 và *trnM* (methionine) dài 67 bp, đây là 2 gen nằm kế tiếp nhau, không có sự ngắt quãng của vùng giao gen. Tiếp theo là gen mã hóa cho *atp6*, dài 516 bp; vùng giao gen dài 18 bp; gen mã hóa *nad2*, dài 870 bp; tiếp đến là vùng giao gen dài 14 bp, tiếp theo là 3 gen RNA vận chuyển, *trnV* (valine) dài 66 bp, *trnA* (alanine) dài 62 bp và *trnD* (aspartate) dài 68 bp. Giữa các gen RNA vận chuyển *trnV* và *trnA* có vùng giao gen kích thước là 30 bp; giữa *trnA* và *trnD* có 5 bp. Sau gen RNA vận chuyển *trnD* là vùng giao gen dài 4 bp; nối tiếp theo đó là gen *nad1* dài 903 bp, vùng giao gen dài 5 bp, tiếp theo là 4 gen RNA vận chuyển *trnN* (asparagine), *trnP* (proline), *trnI* (isoleucine) và *trnK* (lysine), trong đó *trnN* dài 69 bp, cách *trnP* (64 bp) bởi một vùng giao gen dài 4 bp; *trnP* cách *trnI* bằng một trình tự dài 16 bp, *trnI* và *trnK* là 2 gen nằm sát nhau có kích thước là 65 và 66 bp; tiếp theo là gen *nad3*, được bắt đầu cách *trnK* có 1 bp, gen này dài 357 bp và cuối cùng trình tự dài 27 bp của một phần của gen RNA vận chuyển serine (*trnS1*) (Bảng 2).

Kết quả phân tích trật tự các gen nằm trong vùng gen dài 4.252 bp, cho thấy trật tự các gen mã hóa protein và các RNA vận chuyển cũng giống với các loài sán dẹt đã được nghiên cứu trước đây, ngoại trừ

sán máng châu Phi và Ấn Độ (Le *et al.*, 2002). Đây là công bố đầu tiên về trật tự và thành phần gen của loài sán lá gan nhỏ *O. viverrini* của vùng gen ty thể dài 4,2 kb.

**Bảng 2.** Vị trí các gen mã hoá protein và các trình tự nối các gen (vùng giao gen) trong vùng gen ty thể dài 4,2 kb của các chủng *O. viverrini*.

Gen và trình tự	Vị trí 5' → 3'	Độ dài	Bộ mã bắt đầu/bộ mã kết thúc	Ghi chú
<i>nad4</i>	1- 807	807 bp/268 aa	-TAG	
"	808 - 814			Vùng giao gen (7 bp)
<i>trnQ</i>	815 - 877	63 bp		
"	878 - 889			Vùng giao gen (12 bp)
<i>trnF</i>	890 - 955	66 bp		
<i>trnM</i>	956 - 1022	67 bp		
<i>atp6</i>	1023 - 1538	516 bp/171 aa	ATG/TAG	
"	1539 - 1556			Vùng giao gen (18 bp)
<i>nad2</i>	1557 - 2426	870 bp/289 aa	ATG/TAG	
"	2427 - 2440			Vùng giao gen (14 bp)
<i>trnV</i>	2441 - 2506	66 bp		
"	2507 - 2536			Vùng giao gen (30 bp)
<i>trnA</i>	2537 - 2598	62 bp		
"	2599 - 2603			Vùng giao gen (5 bp)
<i>trnD</i>	2604 - 2671	68 bp		
"	2672 - 2675			Vùng giao gen (4 bp)
<i>nad1</i>	2676 - 3578	903 bp/300 aa	GTG/TAG	
"	3579 - 3583			Vùng giao gen (5 bp)
<i>trnN</i>	3584 - 3652	69 bp		
"	3653 - 3656			Vùng giao gen (4 bp)
<i>trnP</i>	3657 - 3720	64 bp		
"	3721 - 3736			Vùng giao gen (16 bp)
<i>trnI</i>	3737 - 3801	65 bp		
<i>trnK</i>	3802 - 3867	66 bp		
"	3868			Vùng giao gen (1 bp)
<i>nad3</i>	3869 - 4225	357 bp/118 aa	GTG/TAG	
<i>trnS1</i>	4226 - 4252	27 bp		Một phần gen <i>trnS1</i>

**Phân tích sự biến đổi về thành phần nucleotide giữa các chủng *O. viverrini* của Việt Nam và Thái Lan trong vùng gen ty thể dài 4,2 kb**

Kết quả giải trình tự cho thấy, vùng DNA giới hạn giữa cặp mỗi Ov8F-OvR có độ dài 4252 bp ở

các chủng *O. viverrini* là OvQN, OvPY3 của Việt Nam và OvKK của Thái Lan. Riêng đối với chủng OvBD1 (Việt Nam), vùng này có độ dài là 4253 bp, do chủng OvBD1 có đột biến thêm vào một bp (T) tại vị trí 816 so với 3 chủng còn lại, tuy nhiên sự đột biến này xảy ra ở vùng giao gen nên cũng không gây

nên sự thay đổi nào về amino acid. Các chuỗi này đã được đăng ký Ngân hàng gen: OvBD1 (số: EU443831), OvQN (số: EU443832), OvPY3 (số: EU443833).

Có tất cả 58 vị trí sai khác giữa các chủng *O. viverrini* với nhau, chiếm tỷ lệ 1,36%. Đây là tỷ lệ sai khác cho phép giữa các chủng trong cùng một loài. Trong số 58 đột biến, có 9/58 là đột biến dị hoán (transversion), chiếm tỷ lệ 15,5%; và 48/58 nucleotide là đột biến đồng hoán (transition), chiếm tỷ lệ 84,5%.

**Phân tích thành phần các nucleotide kiến tạo vùng gen ty thể 4,2 kb của các chủng *O. viverrini* của Việt Nam và Thái Lan**

Một trong những đặc tính sinh học cần phân tích là tìm hiểu thành phần nucleotide được sử dụng để kiến tạo nên gen hoặc hệ gen, cũng như tỷ lệ các nucleotide riêng biệt và tỷ lệ A + T và G + C trong

thành phần chuỗi gen. Kết quả phân tích thành phần các nucleotide sử dụng kiến tạo vùng gen ty thể 4,2 kb (chính xác là 4253 bp của OvBD1 và 4252 bp của OvQN, OvPY3 và OvKK) (Bảng 3) cho thấy, tất cả các chủng sử dụng 44,1 - 44,3% thymine (T); 12,2 - 12,3% cytosine (C); 15,9% adenine (A); và 27,6% guanine (G) để kiến tạo vùng gen ty thể dài 4.252 - 4.253 bp, hoàn toàn đồng nhất với kết quả nghiên cứu trước đây của chúng tôi về loài này (Ngô Thị Hương *et al.*, 2006). Tỷ lệ A + T là 60% và G + C là 40%. Đây là một tỷ lệ sử dụng A + T và G + C thông dụng ở các loài sán lá gan lớn (*Fasciola* spp) và sán lá phổi (*Paragonimus* spp). Như vậy, ở sán lá gan nhỏ *O. viverrini*, tỷ lệ này cũng tương đồng với các loài sán lá nói chung được khảo sát cho đến nay, trừ các loài sán máng *Schistosoma* spp. Sán máng *Schistosoma* spp có tỷ lệ sử dụng A + T vượt trội (đến 70%) và sử dụng các nucleotide G + C ít hơn (khoảng 30%) (Le *et al.*, 2001; 2002; 2004).

**Bảng 3.** Thành phần nucleotide sử dụng trong vùng gen ty thể 4,2 kb (4252 bp) của các chủng Việt Nam và Thái Lan (No: số nucleotide; %: tỷ lệ số với toàn bộ số nucleotide của chuỗi gen 4,2 kb).

	OvBD1		OvQN		OvPY3		OvKK	
	No	%	No	%	No	%	No	%
T	1884	44,3	1876	44,1	1879	44,2	1877	44,2
C	517	12,2	525	12,3	524	12,3	525	12,3
A	676	15,9	677	15,9	677	15,9	676	15,9
G	1175	27,6	1174	27,6	1172	27,6	1174	27,6
A + T	2560	60,2	2553	60,0	2556	60,1	2553	60,1
G + C	1692	39,8	1699	40,0	1696	39,9	1699	39,9

**KẾT LUẬN**

Vùng gen được giải mã có độ dài 4252 nucleotide đối với 3 chủng *O. viverrini* là OvQN, OvPY3 và OvKK, và 4253 nucleotide đối với chủng OvBD1 do có đột biến thêm vào 1 nucleotide thymine (T).

Có tất cả 58 vị trí sai khác giữa các chủng *O. viverrini* với nhau, chiếm tỷ lệ 1,36%, trong đó có 9/58 là đột biến dị hoán (transversion), chiếm tỷ lệ 15,5%; và 48/58 bp là đột biến đồng hoán (transition), chiếm tỷ lệ 84,5%.

Vùng gen này bao gồm 16 gen, trong đó có 5

gen mã hóa protein và 11 gen mã hóa cho các RNA vận chuyển amino acid, với trật tự sắp xếp các gen giống như ở các loài sán đẹt đã được nghiên cứu trước đây.

Tỷ lệ sử dụng A + T là 60% và G + C là 40%, tương tự với các loài sán lá nói chung u. được khảo sát cho đến nay.

**Lời cảm ơn:** Các tác giả xin cảm ơn sự tài trợ kinh phí của Dự án quốc tế ICGB (CRP/VIE05-02) do PGS. TS. Lê Thanh Hòa làm chủ nhiệm và hỗ trợ trang thiết bị của Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học giúp chúng tôi thực hiện công trình này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Jongsuksuntigul P, Imsomboon T (2003) Opisthorchiasis control in Thailand. *Acta Trop* 88(3): 229-232. Review.
- Le TH, Humair PF, Blair D, Agatsuma T, Littlewood DT, McManus DP (2001) Mitochondrial gene content, arrangement and composition compared in African and Asian schistosomes. *Mol Biochem Parasitol* 117: 61-71.
- Le TH, Blair D, McManus DP (2002) Mitochondrial genomes of parasitic flatworms. *Trends Parasitol* 18: 206-213.
- Le TH, Blair D, McManus DP (2004) Codon usage and bias in mitochondrial genome of platyhelminths. *Korean J Parasitol* 42(4): 159-167.
- Le TH, De NV, Blair D, Sithithaworn P, McManus DP (2006) *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*: development of a mitochondrial-based multiplex PCR for their identification and discrimination. *Exp Parasitol* 112(2): 109-114.
- Ngô Thị Hương, Lê Thanh Hòa, Triệu Nguyên Trung, Nguyễn Văn Chương, Bùi Văn Tuấn (2006) Giám định loài sán lá gan nhỏ *Opisthorchis viverrini* ở Bình Định và Phú Yên bằng chỉ thị di truyền hệ gen ty thể. *Tạp chí Y học Việt Nam* 326(9): 47-53.
- Nguyễn Văn ĐỀ, Lê Thanh Hòa (2006) Xác định thành phần loài sán lá gan nhỏ ký sinh trên người tại 10 tỉnh ở Việt Nam bằng phương pháp sinh học phân tử hệ gen ty thể. *Tạp chí Nghiên cứu Y học* 5: 14-18.
- Nicholas KB, Nicholas HB (1999) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by author.
- Sripa B (2003) Pathobiology of opisthorchiasis: an update. *Acta Trop* 88(3): 209-220. Review.
- Sripa B, Kaewkes S, Sithithaworn P, Mairiang E, Laha T, Smout M, Pairojkul C, Bhudhisawasdi V, Tesana S, Thinkamrop B, Bethony JM, Loukas A, Brindley PJ (2007) Liver fluke induces cholangiocarcinoma. *PLoS Med* 4(7): 1148-1155. Review.

## SEQUENCING AND ANALYSIS OF THE MITOCHONDRIAL REGION OF 4.2 KB FOR THE SMALL LIVER FLUKE, *OPISTHORCHIS VIVERRINI*

Ngô Thị Hương<sup>1</sup>, Lê Thanh Hòa<sup>2\*</sup>, Triệu Nguyên Trung<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Malaria, Parasitology and Entomology Quy Nhon

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology

### SUMMARY

A mitochondrial region of 4.2 kb for 3 isolates of the small liver fluke *Opisthorchis viverrini* collected in Vietnam, designated as OvQN (Quang Nam), OvBD1 (Binh Dinh), OvPY3 (Phu Yen) and an isolate from Thailand (OvKK), obtained using PCR strategy was cloned, sequenced and analyzed. Starting with the protein-coding *nad4* and ending with a transfer RNA for aérine (*trnS1*), the 4.2 kb mitochondrial region contains 16 genes, including 5 protein coding genes (3' end of *nad4*, *atp6*, *nad2*, *nad1*, *nad3*) and 11 transfer RNA genes such as *trnQ*, *trnF*, *trnM*, *trnV*, *trnA*, *trnD*, *trnN*, *trnP*, *trnI*, *trnK*, and *trnS1* (part of 5' end). Arrangement for all of these protein-coding and transfer RNA genes is completely similar to that of the platyhelminths previously studied. Analysis of the nucleotide composition constructing this mitochondrial region indicated that all the *O. viverrini* small liverfluke isolates use 44.1 - 44.3% thymine (T); 12.2 - 12.3% cytosine (C); 15.9% adenine (A); and 27.6% guanine (G) for construction of the 4.2 kb region. Overall A + T is 60%, and G + C is 40%, which is same as that stated in other common flatworms, except for schistosomes, to be studied up to date. This is the first report about the gene order and composition of the mitochondrial genome for the small liver fluke *O. viverrini*, and 3 strains of Vietnam origin which are registered in GenBank as OvQN (EU443832), OvBD1 (EU443831), OvPY3 (EU443833).

**Keywords:** *Opisthorchis viverrini*, PCR, mitochondrial region, platyhelminth, identity

\* Author for correspondence: Tel: 84-4-37567297; E-mail: [imibtvn2@gmail.com](mailto:imibtvn2@gmail.com)